

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Henri HESLOT

Première Thèse

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE
ET GÉNÉTIQUE DES SORDARIACÉES

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 14 Juin 1957 devant la Commission d'examen

MM. PLANTEFOL
EICHHORN
L'HERITIER

Président.

} *Examineurs.*

REVUE DE CYTOLOGIE
ET DE BIOLOGIE VÉGÉTALES

12, Rue Cuvier — PARIS V^e

1958

FACULTÉ DES SCIENCES

Nom du Candidat : **HESLOT**

Prénom : **Henri**

Date de la soutenance : 14 juin 1957

Numéro d'ordre : Série A. 3.171 — N° 4.043

HESLOT (Henri). —

Contribution à l'étude cytogénétique et génétique des Sordariacées. — *Paris*, Revue de Cytologie et de Biologie végétales (T. XIX), 1958. In-8°, 236 p., tabl., fig., pl. h.-t.

Th. Sc. Nat. Paris, 1957.

Série A. 3.171. N° 4.043.

HESLOT (Henri). —

Contribution à l'étude cytogénétique et génétique des Sordariacées. — *Paris*, Revue de Cytologie et de Biologie végétales (T. XIX), 1958. In-8°, 236 p., tabl., fig., pl. h.-t.

Th. Sc. Nat. Paris, 1957.

Série A. 3.171. N° 4.043.

HESLOT (Henri). —

Contribution à l'étude cytogénétique et génétique des Sordariacées. — *Paris*, Revue de Cytologie et de Biologie végétales (T. XIX), 1958. In-8°, 236 p., tabl., fig., pl. h.-t.

Th. Sc. Nat. Paris, 1957.

Série A. 3.171. N° 4.043.

HESLOT (Henri). —

Contribution à l'étude cytogénétique et génétique des Sordariacées. — *Paris*, Revue de Cytologie et de Biologie végétales (T. XIX), 1958. In-8°, 236 p., tabl., fig., pl. h.-t.

Th. Sc. Nat. Paris, 1957.

Série A. 3.171. N° 4.043.

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Henri HESLOT

Première Thèse

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE
ET GÉNÉTIQUE DES SORDARIACÉES

Deuxième Thèse

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 14 Juin 1957 devant la Commission d'examen

MM. PLANTEFOL
EICHHORN
L'HERITIER

Président.

} *Examineurs.*



REVUE DE CYTOLOGIE
ET DE BIOLOGIE VÉGÉTALES

12, Rue Cuvier — PARIS Vc

1958



Digitized by the Internet Archive
in 2026

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen.

J. PÉRÈS.

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	SOLEILLET	T	Physique.
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique.	FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.	DANJON	T	Astronomie.
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale.	FROMAGEOT	T	Chimie biologique.
De BROGLIE	T	Théories physiques.	LAPORTE	T	Physique générale et Radio-activité.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	JANET	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	PETIT	T	Biologie maritime.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
LAUGIER	T	Physiologie générale.	GALLIEN	T	Embryologie.
M. CURIE	T	Physique (P. C. B.).	EICHORN	T	Biologie végétale.
BARRABÉ	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.	DE CUGNAC		Biologie végétale (P. C. B.).
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	M ^{lle} CAUCHOIS	T	Chimie-Physique.
J. BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	THELLIER	T	Physique du globe.
PLANTEFOL	T	Botanique.	L'HÉRITIER	T	Génétique.
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.	GRIVET	T	Radio-électricité.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	PONCIN	T	Mécanique des fluides.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	THIRY	T	Mécanique appliquée.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	DURREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres.
WYART	T	Minéralogie.	QUELET	T	Chimie organique.
TEISSIER	T	Zoologie.	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
P. AUGER	T	Physique quantique et Relativité.	CUVILLIER	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
MONAÏER	T	Physiologie des fonctions.	JUNG	T	Pétrographie.
PIVETEAU	T	Géologie.	TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique.
ROCARD	T	Physique (E. N. S.).	WIEMANN	T	Chimie organique structurale.
H. CARTAN	T	Mathématiques (E. N. S.).	JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	VASSY		Physique de l'atmosphère.
FAVARD	T	Mécanique générale.	DESTOUCHES		Théories physiques.
COULOMB	T	Physique du globe.	M. PRUVOST	T	Géologie.
M ^{lle} COUSIN	T	Biologie animale (P.C.B.).	AMIEL	T	Chimie (P. C. B.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	HOCART	T	Minéralogie.
P. DRACH	T	Zoologie.	J.-P. MATHIEU	T	Physique (P. C. B.).
KASTLER	T	Physique.	COUTEAUX	T	Biologie animale (P. C. B.).
EBRUSSI	T	Génétique.	MAY	T	Biologie animale (P. C. B.).
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.	CHOQUET	T	Calcul différentiel et intégral.
RIVIÈRE	T	Géologie (S. P. C. N.).	FELDMANN		Biologie (P. C. B.).
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P. C. B.).	GUINIER	T	Physique (P. C. B.).
LUCAS	T	Recherches physiques.	JOST	T	Biologie (P. C. B.).
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.	FORTET	T	Calcul des probabilités.
ARNULF	T	Optique appliquée.	SCHWARTZ	T	Méthodes Mathématiques de la Physique.
M. MORAND	T	Physique.	CHOUARD	T	Physiologie végétale.

MALAVARD . . . T Aviation.
 BRELOT . . . T Calcul différentiel.
 NORMANT . . . T Chimie (P. C. B.).
 BENARD . . . T Chimie (P. C. B.).
 BUVAT . . . T Botanique (E. N. S.).
 DUGUÉ . . . T Statistiques mathématiques.
 GELOSO . . . Chimie (S. P. C. N.).
 SOULAIRAC . . . T Psychophysiologie.
 ULRICH . . . Physiologie végétale.
 MARÉCHAL . . . T Optique théorique et appli-
 quée.
 KIRRMANN . . . T Théories chimiques.
 CHADEFAUD . . . Botanique.
 DESTRIAU . . . T Physique (M. P. C.).
 M^{lle} LE BRETON . . . Physiologie générale.
 SALEM . . . T Mathématiques générales.
 LELONG . . . T Mathématiques générales.
 DEVILLERS . . . Anat. et Histol. comparées.
 EHRESMANN . . . T Topologie Algébrique.
 FRANÇON . . . Physique (M. P. C.).
 GLANGEAUD . . . T Géographie physique et Géo-
 logie dynamique.
 GODEMENT . . . T Mathématiques (M. P. C.).
 PISOT . . . T Calcul des probabilités.
 ROCH (E.) . . . Géologie.
 SCHATZMANN . . . Astrophysique.
 TERNIER . . . Paléontologie stratigraphi-
 que.

ZAMANSKY . . . T Mathématiques générales.
 JOLIOT . . . T Physique nucléaire et Ra-
 dioactivité.
 LENNUIER . . . Physique (P. C. B.).
 RIZET . . . Génétique.
 M^{me} TONNELAT . . . Théories physiques.
 DIXMIER . . . Mathématiques (M. P. C.).
 SOUCHAY . . . Chimie (P. C. B.).
 AIGRAIN . . . Physique (P. C. B.).
 BRUSSET . . . Chimie (P. C. B.).
 M. LÉVY . . . Physique théorique.
 LENORMANT . . . Physiologie.
 M^{me} CHAIX . . . Chimie biologique.
 M^{me} HUREL-PY . . . Biologie végétale (P. C. B.).
 PIAUX . . . Chimie (P. C. B.).
 BRUN . . . Mécanique expérimentale
 des fluides.
 LEDERER . . . Chimie biologique.
 M^{me} DUBREIL . . . Mathématiques.
 M^{me} LELONG . . . Mathématiques (E. N. S.).
 BELLAIR . . . Géologie (S. P. C. N.).
 COTTE . . . T Physique (M. P. C.).
 DUBOIS (J. E.) . . . Chimie (M. P. C.).
 LAMOTTE . . . Zoologie.
 LE ROLLAND . . . Mécanique des fluides.
 MICHEL . . . Chimie (P. C. B.).

Secrétaire général . . . Ch. MONIER

Contribution à
l'étude cytogénétique et génétique
des Sordariacées ⁽¹⁾

par

H. HESLOT

(1) Ce travail a été effectué au Laboratoire de Génétique de l'Institut National Agronomique, où nous avons bénéficié des conseils bienveillants du regretté Professeur Joseph LEFÈVRE.

Nous remercions tout spécialement MM. les Professeurs PLANTEFOL, EICHORN et L'HÉRITIER, qui ont bien voulu accepter de faire partie de notre Jury de soutenance.

M. R. FERRARY, Assistant de la Chaire de Génétique de l'Institut National Agronomique, nous a fait bénéficier de ses conseils et de son aide pour l'exécution des microphotographies qui illustrent ce travail. Nous lui adressons ici nos remerciements amicaux.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

1. — LES GENRES *SORDARIA* ET *PLEURAGE*

Nous avons étudié le déroulement de la méiose chez une dizaine d'espèces appartenant aux genres *Sordaria* et *Pleurage*. En outre, l'espèce *Sordaria macrospora* Auersw. a fait l'objet d'une étude génétique détaillée. Il s'agit d'Ascomycètes coprophiles faisant partie du groupe des Pyrénomycètes, et de la famille des Sordariacées.

a) LE GENRE *Sordaria*

Dans les conditions naturelles, on trouve les périthèces des *Sordaria* à la surface des fientes d'herbivores. Ces périthèces sont piriformes et présentent une région globuleuse surmontée d'un col (Pl. A, B, C). Le périthèce mûr est brun foncé ou noir. Ses dimensions, pour l'espèce *S. macrospora* prise comme type, sont les suivantes :

$$400 - 550 \mu \times 350 - 400 \mu$$

Chaque périthèce renferme une centaine d'asques, de forme cylindrique, dont la taille à maturité est, pour *S. macrospora*, de $220 - 280 \mu \times 18 - 24 \mu$.

Les ascospores sont au nombre de huit par asque, chez toutes les espèces de *Sordaria*. Elles sont généralement disposées en file linéaire. Cependant, on observe parfois des anomalies.

Les ascospores se différencient au sein du cytoplasme de l'asque. Elles sont d'abord hyalines, avec une paroi mince dépourvue de pigment. Au cours de leur maturation la paroi se pigmente, devenant successivement jaune, jaune verdâtre, brune puis noire à maturité. Elles ont une forme elliptique.

Nous avons étudié cytologiquement les deux espèces :

— *S. fimicola* (Rob.) Ces. et de Not.

— *S. macrospora* Auersw.

Pour la première espèce, la taille des ascospores mûres est, selon le milieu de culture et la provenance de la souche : $18 - 28 \mu \times 8 - 18 \mu$.

Pour la deuxième, on note : $23 - 32 \mu \times 14 - 23 \mu$.

Toutes les espèces appartenant au genre *Sordaria* sont homothalliques.

b) LE GENRE *Pleurage*

Comme pour les *Sordaria*, les périthèces de *Pleurage* se rencontrent à la surface des fientes d'herbivores.

La forme du périthèce est très variable suivant les espèces. Pour certains, tel *P. curvula*, le col est pratiquement inexistant. Pour d'autres, au contraire, le col est bien différencié (Pl. A, B, C). Le périthèce mûr est, selon les espèces, de couleur brun clair à brun très foncé.

Le nombre d'asques que renferme chaque périthèce est extrêmement variable. Ce nombre est souvent difficile à évaluer, car on y rencontre des asques à tous les degrés de développement. Il varie entre une centaine (chez *P. curvula*) et une dizaine chez les espèces à asques polysporés (*P. setosa*).

La forme de l'asque varie : cylindrique quand les spores sont disposées sur un rang ; plus large quand les ascospores sont sur deux rangs ; claviforme chez *P. setosa*.

Nous avons étudié cytologiquement les espèces suivantes :

— *Pl. decipiens* (Wint.) Kze.

Cette espèce comporte quatre variétés distinctes ayant respectivement des asques à 8, 16, 32, 64 ascospores. Celles-ci sont disposées sans ordre.

— *Pl. curvula* (de Bary) Kze.

Les asques renferment 8 ascospores, généralement disposées sur deux rangs.

— *Pl. curvula* var. *coronifera* (Grove) nov. comb.

Les asques renferment 8 ascospores, disposées sur deux rangs, mais beaucoup plus grosses.

— *Pl. fimiseda* (Ces. et de Not.) Griffiths.

Les asques de cette espèce renferment 8 ascospores de très grande taille, disposées sur deux rangs.

— *Pl. setosa* (Wint.) Kze.

Il produit des asques claviformes renfermant 128 spores disposées en désordre.

— *Pl. minuta* (Fuck) Kze.

Cette espèce comporte deux formes ayant respectivement des asques à 8 et 4 ascospores, généralement disposées en file linéaire.

— *Pl. anserina* (Ces.) Kze.

Asques renfermant 4 spores, généralement disposées sur un rang.

— *Pl. zygospora* (Spegazzini) Kze.

Il s'agit d'une espèce très particulière dont l'asque mûr renferme 8 spores doubles, et sur la genèse desquelles nous reviendrons.

Chez toutes les espèces de *Pleurage*, les ascospores mûres sont ellipsoïdes. Elles sont munies à l'une de leurs extrémités d'un appendice secondaire pointu.

Un deuxième appendice secondaire est inséré à l'autre extrémité de la spore.

Les ascospores se différencient au sein du cytoplasme de l'asque et deviennent rapidement claviformes. Une cloison apparaît, séparant l'appendice primaire (qui demeure incolore) de la spore proprement dite qui, d'abord hyaline, se charge en pigment et devient successivement jaune, jaune-verdâtre, brune, puis noire. Les ascospores mûres présentent un pore germinatif qui est situé à l'opposé de l'appendice primaire.

La taille moyenne des ascospores mûres (il s'agit de mesures effectuées sur la partie noire des spores, sans tenir compte des appendices primaires ou secondaires) est la suivante, d'après Cl. MOREAU (110) :

<i>Pl. curvula</i>	:	27	×	14	μ
<i>Pl. curvula</i> var. <i>coronifera</i>	:	35	×	18	μ
<i>Pl. fimiseda</i>	:	58	×	30	μ
<i>Pl. decipiens</i> :					
f. 8 sporée	:	39	×	20	μ
f. 16 sporée	:	35	×	20	μ
f. 32 sporée	:	35	×	20	μ
f. 64 sporée	:	34	×	20	μ
<i>Pl. setosa</i>	:	17	×	11,5	μ
<i>Pl. minuta</i>					
f. 8 sporée	:	19,5	×	13	μ
f. 4 sporée	:	24	×	13	μ
<i>Pl. anserina</i>	:	37	×	19	μ
<i>Pl. zygospora</i> (1/2 spores)	:	35	×	16	μ

2. — L'ESPECE *SORDARIA MACROSPORA* AUERSW.

Après avoir étudié les caractéristiques morphologiques et physiologiques des diverses espèces de *Sordaria* et *Pleurage* ci-dessus mentionnées, nous avons choisi, comme objet d'études génétiques, l'espèce *Sordaria macrospora* Auersw. Ce choix a été fait pour les raisons suivantes :

a — Le cycle de développement de ce champignon est très court : 8 jours à 29°C.

b — En dehors de milieux naturels, tels que le crottin de cheval (stérilisé), on peut le cultiver facilement sur un milieu simple, en particulier le milieu de Dodge au moût de maïs.

c — La disposition linéaire des ascospores dans l'asque et leur taille (21 × 17 μ en moyenne). Ces ascospores sont suffisamment grosses pour

pouvoir être extraites des asques, dans leur ordre, avec une aiguille fine, sous le contrôle d'une loupe binoculaire, et repiquées individuellement.

d — Le caractère homothallique de cette espèce. En effet, un nombre très restreint d'Ascomycètes homothalliques a fait jusqu'à présent l'objet d'études génétiques ; tout au plus peut-on citer *Aspergillus nidulans* étudié par PONTECORVO et ses collaborateurs (129 à 134, 140) et *Glomorella cingulata* étudié par LUCAS, CHILTON, EDGERTON, WHEELER, OLIVE, ERNEST, Mc GAHEN (99, 106, 164).

Son caractère homothallique fait en outre de *Sordaria macrospora* un matériel extrêmement favorable à l'obtention de mutations sous l'action des radiations (rayons X) et des substances mutagènes.

Le type de *S. macrospora* que nous avons utilisé dans nos études cyto-logiques et génétiques est la Souche n° 573 de la mycothèque du Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. Compte tenu de la taille de ses ascospores ($21 \times 17 \mu$ en moyenne), cette souche occupe une position limite au sein de l'espèce.

3. — TECHNIQUE D'ISOLEMENT

La plupart des espèces de *Sordaria* et de *Pleurage* que nous avons étudiées ont été isolées par nous dans la nature. La technique a consisté à ramasser, en des régions aussi variées que possible, des excréments d'herbivores (lapin, lièvre, mouton, cheval, vache). Ces excréments ont été placés dans des boîtes de Pétri, humidifiés si nécessaire et laissés à la température du laboratoire.

Au bout de quelques jours ou de quelques semaines, il se développe, en surface, des périthèces qui, à maturité, sont prélevés à l'aide d'une aiguille, sous le contrôle de la loupe binoculaire, placés sur une lame dans une goutte d'eau, et écrasés sous une lamelle. L'examen des caractères morphologiques du périthèce, des asques et des spores permet d'identifier l'espèce. Les ascospores mûres sont alors repiquées sur crottin de cheval frais stérilisé (1 h. à 110°C). Plusieurs repiquages sont souvent nécessaires avant qu'on parvienne à obtenir une culture pure.

Toutes les espèces de *Pleurage* dont nous avons fait l'étude ont été isolées de cette façon.

Par contre, bien que les deux espèces *S. fimicola* et *S. macrospora* aient été également isolées par nous à plusieurs reprises dans la nature, les types étudiés proviennent du Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle :

<i>S. fimicola</i>	: Souche n° 571
<i>S. macrospora</i>	: Souche n° 573

Enfin, malgré des recherches étendues, nous ne sommes pas parvenu à réisoler l'espèce *Pl. Dagobertii*, trouvée une seule fois par CL. MOREAU sur des crottes de lapin récoltées en forêt de Montmorency, et décrite par lui dans sa thèse (110). Nous aurions souhaité faire l'étude cytologique de cette espèce, car elle présente un caractère exceptionnel. En effet, les appendices primaires des ascospores sont tous dirigés vers le sommet de l'asque. Par opposition, toutes les autres espèces de *Pleurage* ont l'appendice primaire des ascospores dirigé vers la base de l'asque.

4. — MILIEU DE CULTURE

Pour toutes les espèces de *Pleurage*, nous n'avons utilisé comme milieu de culture que le crottin de cheval frais stérilisé.

Pour *S. fimicola* et *S. macrospora*, tout en utilisant dans certains cas le même milieu, nous avons, en général, employé le milieu de Dodge au moût de maïs, qui est préparé comme suit :

Mettre dans 1 litre d'eau 40 grammes de farine de maïs. Placer le mélange à l'étuve à 60°C pendant une nuit. Filtrer, compléter à 1 litre. Ajouter 20 grammes de gélose. Stériliser (1/2 heure à 110°C).

L'expérience prouve que les ascospores de *S. macrospora* repiquées sur le milieu de Dodge germent très mal. Par contre, BRETZLOFF (23, 24), LILLY et BARNETT (171), ont montré que l'addition d'acétate de sodium à ce milieu favorise considérablement la germination des ascospores de *S. fimicola*. Nous avons constaté effectivement que, sur le milieu de Dodge additionné d'acétate de sodium dans la proportion de 2 %, le pourcentage de germination des ascospores de *S. macrospora* est très élevé (supérieur à 95 %). Il en résulte que, dans tous les cas où l'analyse génétique impose un repiquage monospore, le milieu de Dodge additionné d'acétate de sodium a été utilisé. Toutefois, il est à remarquer que le champignon ne peut accomplir son cycle complet sur un tel milieu : il se forme des ébauches de périthèces, mais celles-ci n'évoluent jamais jusqu'à la formation d'asques. En conséquence, après germination des ascospores sur un milieu à l'acétate de sodium, le jeune mycélium doit être transféré sur un milieu de Dodge sans acétate pour pouvoir fructifier normalement.

Dans le cas où une souche de *Sordaria* ou de *Pleurage* se trouve polluée accidentellement par des bactéries, il est facile de s'en débarrasser en incorporant au milieu de culture un mélange de pénicilline et de streptomycine.

La méthode, qui nous a été indiquée par M. MARIAT, de l'Institut Pasteur, est la suivante : dans une fiole contenant 1 gr. (1.000.000 unités) de streptomycine, on ajoute 5 cm³ d'eau stérile. On prélève aseptiquement 1 cm³ de cette solution et on le verse dans une fiole renfermant

100.000 unités de pénicilline, on ajoute ensuite 19 cm³ d'eau stérile, de façon à compléter à 20 cm³.

Dans ces conditions, chaque cm³ du liquide renferme 5.000 unités de pénicilline et 10.000 unités de streptomycine. Il suffit d'incorporer 1 à 2 gouttes de ce liquide à 10 cm³ du milieu de Dodge. Le mélange s'effectue avec le milieu liquide, mais à une température suffisamment basse (40°C) pour que les deux antibiotiques ne soient pas détruits par la chaleur. Sur un tel milieu, la croissance et la fructification de *Sordaria macrospora* s'effectuent normalement.

5. — EXTRACTION ET REPIQUAGE DES ASCOSPORES

Une analyse génétique précise a imposé, chez *S. macrospora*, l'extraction des 8 ascospores de chaque asque, dans leur ordre, et leur repiquage sur un milieu de Dodge additionné d'acétate de sodium.

Nous opérons de la façon suivante :

Un ou plusieurs périthèces mûrs sont prélevés en surface de la culture. On les place sur une lame, dans une goutte d'eau, on pose dessus une lamelle et on écrase les périthèces par pression du doigt sur cette dernière.

En général, les bouquets d'asques intacts se trouvent ainsi expulsés dans l'eau. Il est alors facile de prendre un de ces bouquets à l'aide d'une aiguille fine et de le transférer dans une goutte d'eau propre. Sous contrôle d'une loupe binoculaire, on détache du bouquet un asque intact, en utilisant deux aiguilles fines emmanchées (les aiguilles à coudre les plus fines, n° 12, sont très satisfaisantes pour ce travail). On s'arrange pour opérer toujours dans une mince couche d'eau qui facilite la manipulation. Les ascospores sont alors extraites de l'asque, une par une, et dans l'ordre. On les prend ensuite avec l'extrémité de l'aiguille où elles se collent et on les transfère sur le milieu de Dodge, coulé en boîte de Pétri. Chaque boîte (diamètre : 10 cm) est divisée en seize carrés, à l'aide d'un quadrillage dessiné sur le fond, à l'extérieur, à l'aide d'un crayon noir gras. A l'intérieur de ces carrés, on repique une seule spore, ou, éventuellement, les deux spores sœurs, issues de la troisième division dans l'asque.

Après germination des ascospores, les jeunes cultures sont repiquées isolément en tubes contenant le milieu de Dodge sans acétate.

CHAPITRE II

ETUDE CYTOLOGIQUE

Les genres *Sordaria* et *Pleurage* comportant des types extrêmement variés en ce qui concerne le nombre, la taille et la disposition des ascospores dans l'asque ; nous avons estimé qu'il serait intéressant d'étudier le déroulement de la méiose chez les espèces déjà mentionnées précédemment. Nous avons également cherché à élucider l'origine et la nature de l'appendice primaire porté par les ascospores de *Pleurage*.

1. — TECHNIQUE

Nous avons d'abord utilisé la technique classique comportant la fixation des périthèces par le liquide de Helly, lavage, déshydratation, imprégnation par le toluène, puis inclusion dans la paraffine. Enfin, le matériel est découpé au microtome, en coupes dont l'épaisseur a varié entre 10 et 15 μ . Les coupes obtenues ont été colorées par le réactif de Schiff (Feulgen). Un autre procédé a consisté à fixer au Navaschine et à colorer, soit par l'hématoxyline, soit par le violet de gentiane.

Toutefois, il nous est rapidement apparu que cette méthode avait un inconvénient majeur : quelle que soit l'orientation des coupes, il est rare qu'un asque se trouve sectionné selon son grand axe. En effet, les asques se trouvent insérés à la base interne des périthèces et divergent en formant un cône. Il en résulte que les coupes montrent, en général, de nombreux fragments d'asques très incomplets qui ne permettent que difficilement d'avoir une idée précise des phénomènes nucléaires qui s'y passent.

Pour ces raisons, nous avons recherché une méthode susceptible de conserver l'intégrité des asques. Une telle méthode avait été mise au point antérieurement par Mc CLINTOCK (105) et CUTTER (19, 20, 21) pour l'étude cytologique de l'ascomycète *Neurospora*. Nous avons modifié cette méthode comme suit :

Selon le milieu de culture (crottin de cheval ou milieu de Dodge), des fragments de fumier ou des carrés de gélose portant des périthèces au stade convenable sont fixés par le mélange de Carnoy :

Alcool absolu	6
Chloroforme	3
Acide acétique pur	1

Pour s'assurer d'une bonne fixation, on s'arrange toujours pour avoir un gros excès de liquide fixateur. En outre, on remplace le liquide initial par du liquide frais six heures environ après le début de la fixation.

Le matériel doit séjourner dans le fixateur pendant huit à dix jours avant de pouvoir être coloré avec succès. En effet, les asques sont en général remplis d'inclusions lipidiques qui ne disparaissent qu'à la longue, en se dissolvant dans l'alcool et le chloroforme.

Cependant, après ce délai, le matériel n'est guère utilisable que pendant une dizaine de jours. Ensuite, il se modifie et il devient impossible de le colorer de façon satisfaisante.

Les colorants employés ont été de deux sortes, soit le Carmin de Belling, soit l'orcéine acétique, qui ont été préparés comme suit :

(a) Carmin de Belling :

Mélanger 45 cm³ d'acide acétique pur et 55 cm³ d'eau distillée. Chauffer jusqu'à ébullition. Ajouter 0,5 gr de Carmin n° 40. Filtrer après refroidissement. Ajouter une ou deux gouttes d'acide acétique à 45 % saturé d'acétate de fer.

(b) Acéto-orcéine :

Préparer une solution de réserve, contenant 2,2 % d'orcéine dans de l'acide acétique pur. Au moment de l'emploi, diluer en ajoutant, à 45 cm³ de la solution de réserve, 55 cm³ d'eau distillée.

L'acéto-orcéine colore fort bien les chromosomes mais pas les nucléoles. Au contraire, le Carmin de Belling colore à la fois chromosomes et nucléoles.

Pour réaliser la coloration, on place sur une lame une goutte de colorant. On prélève dans le liquide fixateur plusieurs périthèces (dix à vingt) qu'on débarrasse soigneusement des fragments de gélose ou fumier qui peuvent leur rester attachés. Ces périthèces sont alors immergés dans la goutte de colorant. On pose une lamelle sur l'ensemble et on exerce avec le doigt une pression suffisamment forte pour que les périthèces éclatent et libèrent leurs bouquets d'asques. On ôte ensuite la lamelle et, avec une aiguille fine, sous le contrôle de la loupe binoculaire, on retire tous les fragments de paroi. Il ne reste alors dans la goutte que des bouquets d'asques, pour la plupart intacts, ou éventuellement des asques entiers isolés. On place alors une lamelle propre.

Le colorant ne se fixe que lentement sur les asques, à la température ambiante et, au moins pour le Carmin de Belling, il est nécessaire de chauffer pour obtenir rapidement une coloration convenable. On utilise une lampe à alcool. On chauffe la lame avec précaution, en évitant de faire bouillir le liquide. Si celui-ci s'évapore par trop, on place du liquide frais sur le bord de la lamelle. L'évolution de la coloration est suivie à la loupe binoculaire, puis au microscope. Quand elle est jugée satisfaisante, on retire l'excès de liquide avec un buvard. On peut aussi, pour

faciliter l'examen de certaines structures, ou compter plus aisément les chromosomes, exercer une forte pression sur la lamelle, à l'aide du doigt, de façon à écraser les asques.

La préparation ainsi réalisée est lutée (mélange résine + lanoline) et doit être examinée dans les six heures. En effet, ces préparations se conservent mal en général, car le colorant continue à se fixer sur le cytoplasme et obscurcit les figures de division. Cette détérioration progressive continue à se produire, même si la préparation est conservée en glacière.

Pour l'étude des préparations, nous avons utilisé un microscope équipé en contraste de phase. L'observation des diverses étapes de la méiose s'est trouvée, de ce fait, considérablement facilitée. Ceci nous a également permis de mettre en évidence un centrosome et de suivre en détail son comportement, ce qui aurait été impossible si l'examen des préparations avait été réalisé avec un microscope ordinaire.

2. — ETUDE CYTOLOGIQUE INDIVIDUELLE DES ESPECES

a) *S. macrospora*

L'examen des hyphes de cette espèce révèle que les articles sont toujours plurinucléés (jusqu'à 10 noyaux et parfois plus).

Les asques prennent naissance par le processus classique du crochet d'angardien : la cellule terminale binucléée de l'hyphe ascogène est le siège d'une mitose conjuguée ; en même temps, l'extrémité de l'hyphe se recourbe en crochet ; l'un des quatre noyaux s'engage dans ce crochet et deux cloisons se forment qui délimitent une cellule terminale uninucléée, l'article suivant étant binucléé. Cet article constitue le jeune asque en voie de formation.

Ultérieurement, la première et la troisième cellule fusionnent en redonnant un article binucléé susceptible de produire de nouveaux asques par le mécanisme que nous venons de décrire.

Très rapidement, le jeune asque s'allonge et prend une forme de massue. Les deux noyaux qu'il contient au début, et dont chacun renferme un gros nucléole, fortement colorable par le Carmin de Belling, fusionnent.

Les deux nucléoles fusionnent également. A ce stade, le jeune asque renferme donc un unique noyau avec un très gros nucléole (Pl. 1, fig. 1).

Chez l'Ascomycète *Neurospora*, qui appartient au groupe des Pyrénomycètes, au même titre que *S. macrospora*, Mc CLINTOCK a étudié en détail la fusion nucléaire dans le jeune asque et l'appariement des chromosomes homologues (105). Elle a constaté qu'à la suite de la fusion des deux noyaux les chromosomes subissent une contraction très marquée. C'est dans cet

état que les chromosomes homologues s'apparient. Puis, lorsque l'appariement est achevé, les chromosomes s'allongent jusqu'à atteindre leur degré maximum d'extension. Ces conclusions ont été confirmées et étendues par SINGLETON (153).

Etant donné que le cytoplasme des jeunes asques fixe très fortement le colorant, nous n'avons pu établir si la contraction signalée par Mc CLINTOCK chez *N. crassa* a lieu également chez *S. macrospora*.

Ce n'est qu'en diacinèse que les chromosomes peuvent être identifiés et comptés avec certitude. A ce stade, on trouve sept formations. Dans chacune, on peut voir au moins deux filaments s'entrecroisant par endroits (chiasma). En aucun cas, nous n'avons pu mettre en évidence les quatre filaments certainement présents à ce stade, comme les études génétiques rapportées plus loin nous portent à le croire. L'un des bivalents est attaché au nucléole. On est donc fondé à penser que ce bivalent possède un organisateur nucléolaire, ce qui est en accord avec ce que Mc CLINTOCK et SINGLETON ont signalé chez *N. crassa* (105, 153).

La contraction des sept bivalents s'accroît et on aboutit au stade de la métaphase I : le fuseau qui semble se former à l'intérieur de la membrane nucléaire n'est que rarement visible avec netteté. L'un des sept bivalents est plus gros que les autres (Pl. 20, fig. 1).

En interphase I, on constate que les centromères des sept chromosomes restent étroitement groupés du côté du noyau qui a été précédemment occupé par le pôle du fuseau. Les bras des chromosomes s'allongent progressivement et s'étendent dans la cavité nucléaire (Pl. 1, fig. 3).

Plus tard, les chromosomes se contractent à nouveau et se disposent en plaques équatoriales : c'est la métaphase II (Pl. 1, fig. 4), bientôt suivie par le clivage longitudinal des chromosomes et leur montée aux pôles (anaphase II) (Pl. 2, fig. 1). Les deux fuseaux sont superposés et n'empiètent pas l'un sur l'autre.

En interphase II (Pl. 2, fig. 2 et Pl. 20, fig. 2 et 3), les centromères des sept chromosomes sont groupés. Dans cette région, on trouve un élément en forme de bâtonnet légèrement incurvé : la présence d'un élément de cette sorte (désigné par les auteurs sous le nom de centriole ou centrosome) a été signalée à diverses reprises chez plusieurs espèces du genre *Neurospora*, en particulier par DODGE (30), WILCOX (170), COLSON (18), SINGLETON (153).

L'étude d'un grand nombre d'asques en interphase II révèle l'évolution progressive vers la prophase III. On constate que chacun des quatre bâtonnets, ou centrosomes, se clive longitudinalement, les deux moitiés s'éloignant progressivement l'une de l'autre en direction transversale, en restant réunies par une substance amorphe. Les chromosomes se contractent et se disposent en plaques équatoriales. C'est la métaphase III. Ce stade a

un aspect très caractéristique, car chacune des quatre plaques équatoriales présente à ses deux pôles les centrosomes issus du précédent clivage (Pl. 2, fig. 3 et Pl. 20, fig. 4 et 5).

Les chromosomes se clivent longitudinalement et on assiste à la montée aux pôles, en direction des centrosomes (Pl. 2, fig. 4). C'est l'anaphase III. En général, le mouvement anaphasique est simultanée pour chacun des quatre groupes de chromosomes. Toutefois, on observe occasionnellement un léger manque de synchronisme entre le sommet et la base de l'asque. En général, les quatre fuseaux sont superposés et n'empiètent pas les uns sur les autres.

En fin d'anaphase III, les centromères de chaque chromosome viennent s'accoler étroitement contre le centrosome correspondant (Pl. 2, fig. 4).

Une membrane nucléaire se reconstitue. L'asque renferme alors huit noyaux à l'intérieur desquels les chromosomes se dés spiralisent peu à peu. Chaque noyau possède son centrosome particulier auquel il semble attaché par une zone de cytoplasme différencié (Pl. 3, fig. 1 et 2 et Pl. 21, fig. 1 et 2).

A ce moment intervient la délimitation des ascospores. Il ne paraît pas douteux que les centrosomes y jouent un rôle actif. C'est en effet à partir de chaque centrosome qu'une masse de cytoplasme, englobant à la fois le centrosome et le noyau correspondant, se trouve progressivement délimitée. Le phénomène peut être observé avec une particulière netteté dans certains asques où les huit spores se trouvent à divers degrés de délimitation. On doit noter qu'à ce moment les centrosomes semblent subir un nouveau clivage (Pl. 3, fig. 3 et Pl. 21, fig. 3, 4, 5 et 6).

Ces conclusions sont en plein accord avec celles formulées par DODGE (56), WILCOX (170), Mc CLINTOCK (105), SINGLETON (153) sur diverses espèces appartenant au genre *Neurospora*. Toutefois, ces auteurs ont constaté qu'à partir de chaque centrosome un groupe de fibrilles divergent et interviennent dans la délimitation de l'ascospore. Nous n'avons pas observé de telles fibrilles chez *S. macrospora*.

Peu après la délimitation des ascospores, le centrosome demeure encore visible contre la paroi, à l'une des extrémités de la spore. Une nouvelle division nucléaire intervient ensuite. Elle est en général plus difficile à suivre que les précédentes, car la paroi des ascospores s'est épaissie et commence à se pigmenter. Si nous avons pu suivre le déroulement de cette mitose, nous ne sommes pas parvenu à voir les centrosomes à ce stade. Toutefois, COLSON (18) a réussi à les observer chez *N. tetrasperma* : elle les figure comme de petits bâtonnets très courts aux pôles des fuseaux de division.

En définitive, la spore mûre renferme donc deux noyaux, qu'on peut présumer génétiquement identiques puisqu'ils sont issus d'une mitose ordinaire (Pl. 3, fig. 4).

En ce qui concerne les nucléoles, on sait que le noyau de fusion du

jeune asque renferme un nucléole unique très gros auquel se trouve attachée, au cours de la prophase I, l'une des paires de chromosomes.

En métaphase I, cette paire s'en est détachée et les sept bivalents se disjoignent et leurs moitiés montent aux pôles, le nucléole restant sur place. On le voit diminuer progressivement de taille et disparaître peu à peu. En même temps, un nouveau nucléole se forme dans chacun des deux noyaux de la télophase I, vraisemblablement sous l'influence des organisateurs nucléolaires portés par l'un des sept chromosomes.

En métaphase II, chaque plaque possède son nucléole, situé à proximité immédiate. En télophase II, un nucléole se reforme dans chacun des quatre noyaux.

Il en est de même à tous les autres stades. En particulier, chaque ascospore mûre renferme deux noyaux possédant chacun son nucléole, très facile à mettre en évidence par le Carmin de Belling.

Ainsi donc, d'une façon générale, à chaque télophase un nouveau nucléole se reconstitue dans chaque noyau, mais il arrive fréquemment que les nucléoles de la division précédente subsistent. On observe ainsi parfois :

en télophase I : 2 + (1) nucléoles

en télophase II : 4 + (2) nucléoles

en télophase III : 8 + (4) nucléoles.

L'étude cytologique des extrémités d'hyphes en croissance montre de nombreuses mitoses, mais — en raison de la petitesse des noyaux — il est très difficile de compter les chromosomes avec précision. Nous croyons cependant pouvoir affirmer que ce nombre est de $n = 7$.

Dans l'asque, les noyaux sont beaucoup plus gros et leur étude plus aisée. Nous avons vu qu'il y avait sept bivalents en métaphase I qui est ainsi une mitose réductionnelle (hétérotypique). En métaphase II, on retrouve sept chromosomes qui se clivent longitudinalement et dont les moitiés montent aux pôles en anaphase II ; par conséquent, la métaphase II est une métaphase équationnelle (homéotypique). En métaphase III, chacune des quatre plaques comporte encore sept chromosomes. Il n'y a donc pas de brachyméiose au sens de GWYNNE-VAUGHAN (60 à 62, 73 à 79).

On sait d'ailleurs que l'absence totale de brachyméiose est progressivement établie chez toutes les espèces où cet auteur avait cru l'observer. Par conséquent, le seul stade diploïde dans le cycle de *S. macrospora* est constitué par le noyau de fusion du jeune asque.

Il est à noter que la continuité du centrosome n'a pu être établie. D'une part, nous n'avons pas réussi — malgré des essais répétés — à identifier cet élément dans les mitoses des hyphes, et d'autre part, on ne commence à l'apercevoir, dans les asques, qu'au stade de l'interphase II. Nous verrons plus tard qu'il a été possible de suivre le centrosome pendant une période beaucoup plus longue du cycle de certains *Pleurage*.

b) *S. fimicola*

Cette espèce est très voisine de *S. macrospora* et n'en diffère que par la forme et la taille de ses ascospores, caractères dont le déterminisme génétique est relativement simple, comme nous le verrons plus tard.

Le déroulement de la méiose chez *S. fimicola* est en tous points comparable à ce que nous avons observé chez *S. macrospora*.

On compte sept bivalents en métaphase I, l'un d'entre eux ayant une taille nettement supérieure à celle des autres (Pl. 24, fig. 1 et 2).

Le centrosome, qui a la même forme en bâtonnet que celui de l'espèce précédente, n'est visible qu'à partir de l'interphase II.

.c) *Pleurage decipiens*

Nous avons signalé précédemment que cette espèce comprend quatre formes distinctes dont les asques renferment 8, 16, 32 ou 64 ascospores. Nous avons étudié la méiose chez les deux premières formes.

Les asques prennent naissance par le mécanisme du crochet dangeardien. Les deux noyaux inclus dans le jeune asque fusionnent. Pour les mêmes raisons que précédemment (fixation intense du colorant sur le cytoplasme du jeune asque), il n'a pas été possible de voir si l'appariement des chromosomes homologues était précédé d'une phase de contraction (Pl. 22, fig. 1).

Ce n'est qu'au pachytène que les chromosomes deviennent nettement visibles et comptables. Nous avons cru pouvoir identifier à ce stade six bivalents. C'est dès ce moment que le centrosome fait son apparition, mais cette fois à l'intérieur du noyau. Il s'agit déjà d'une structure très nettement double dont il est impossible de dire si elle provient du simple clivage longitudinal d'un centrosome unique initial, ou au contraire de l'appariement des deux centrosomes apportés par chacun des noyaux qui ont fusionné. L'impossibilité d'identifier un centrosome avec certitude dans chacun des deux noyaux du très jeune asque, avant leur fusion, ne permet pas de répondre à cette question.

Sans que nous puissions être formel sur ce point, il nous a semblé que le centrosome (double) était attaché à l'extrémité d'un des bivalents (Pl. 10, fig. 1).

Ultérieurement, les chromosomes continuent à se raccourcir jusqu'au stade de la métaphase I. A ce moment, les deux moitiés du centrosome se sont séparées et ont gagné les pôles. Les bivalents sont disposés en plaque équatoriale dans la région médiane du fuseau qui est longitudinal (Pl. 22, fig. 2).

En anaphase I, les deux moitiés de chaque bivalent se séparent et se rendent aux pôles. Les centromères de chaque chromosome viennent s'acco-

ler étroitement contre le centrosome correspondant (Pl. 10, fig. 3 et Pl. 22, fig. 3).

En interphase I, on peut voir que les centromères restent groupés en un point, contre le centrosome. Les bras des chromosomes se sont déspiralisés et allongés et divergent en formant un cône de filaments (Pl. 10, fig. 4).

Plus tard, on constate que chacun des deux centrosomes se clive longitudinalement. Les deux moitiés s'éloignent l'une de l'autre tout en restant reliées par une masse de cytoplasme différencié. Les chromosomes se contractent et se disposent en deux plaques équatoriales dont les pôles sont occupés par les centrosomes. C'est la métaphase II, bientôt suivie par l'anaphase II (Pl. 10, fig. 5).

En interphase II, les quatre noyaux montrent une structure comparable à celle des noyaux d'interphase I, c'est-à-dire que, dans chacun d'eux, les centromères sont appliqués étroitement en un point contre le centrosome (Pl. 11, fig. 1 et 2 ; Pl. 22, fig. 4 et 5).

Les fuseaux de l'anaphase II étant longitudinaux et limités à leurs extrémités par les deux centrosomes, il en résulte qu'en l'absence de tout mouvement ultérieur, la disposition en interphase II doit être celle indiquée sur la figure 1, Pl. 11. Toutefois, on constate qu'à un stade ultérieur la disposition s'est modifiée, les centrosomes occupant maintenant la région médiane de l'asque et les quatre noyaux les régions supérieure et inférieure (Pl. 11, fig. 2).

En prophase III, chaque centrosome se clive suivant sa longueur, et les deux moitiés s'éloignent en direction transversale. Les chromosomes se contractent et se disposent en quatre plaques équatoriales, à égale distance de leurs centrosomes respectifs. C'est la métaphase III (Pl. II, fig. 3), à laquelle fait rapidement suite l'anaphase III (Pl. II, fig. 4). En télophase III, huit noyaux se reconstituent, qui possèdent chacun leur centrosome, auxquels ils semblent reliés par une zone cytoplasmique différenciée se colorant avec plus d'intensité que le cytoplasme environnant. A ce moment, on peut voir que chaque centrosome a tendance à s'éloigner de son noyau en direction de la base de l'asque ; il se peut que ce mouvement soit une conséquence de l'allongement de l'asque dans son ensemble. Quoi qu'il en soit, il n'est pas rare de trouver des centrosomes séparés de leur noyau par une distance qui peut être de l'ordre de deux diamètres nucléaires (Pl. 11, fig. 5 et Pl. 24, fig. 1 et 2).

C'est alors que débute la délimitation des ascospores. Elle se marque d'abord par une grande colorabilité de la région cytoplasmique située entre le centrosome et son noyau. Rapidement cette zone déborde et englobe le noyau. Ainsi se constituent huit ascospores dont la forme en massue ne fait que s'accroître ultérieurement. Le centrosome conserve sa position à l'extrémité du futur appendice primaire de l'ascospore, mais il perd rapi-

dement sa colorabilité et bientôt ne peut plus être mis en évidence (Pl. 23, fig. 3, 4).

Dans chaque ascospore ainsi délimitée, le noyau subit une mitose supplémentaire. Cette mitose, où les centrosomes ne sont pas visibles, est difficile à voir, car la paroi des spores se pigmente rapidement. Toutefois, nous avons pu établir que des deux noyaux formés, l'un reste dans la partie renflée, alors que l'autre émigre dans la base effilée, futur appendice primaire. Ensuite une cloison sépare ces deux éléments. Le noyau contenu dans l'appendice primaire, qui demeure hyalin, dégénère.

En ce qui concerne les nucléoles, leur comportement est semblable à celui observé chez *S. macrospora*. L'un des chromosomes est porteur d'un organisateur nucléolaire qui reconstitue un nouveau nucléole dans chaque noyau télophasique, alors que l'ancien nucléole dégénère lentement sur place.

Chez la forme à seize ascospores de *Pl. decipiens*, la méiose se déroule d'une façon très semblable à celle que nous venons de décrire pour le type à huit spores, mais il y a bien entendu une mitose supplémentaire. En interphase II et III, on observe le mouvement de noyaux déjà signalé qui regroupe les centrosomes dans la partie médiane de l'asque (Pl. 12, fig. 1 et 2).

Enfin, nous avons compté ici, en métaphase I, sept bivalents. Ce nombre diffère d'une unité, par rapport à la forme à huit spores. Toutefois, en raison de l'extrême petitesse des chromosomes, il semble légitime d'élever quelques doutes sur la valeur de cette différence. Pour notre part, nous aurions tendance à considérer que les deux formes à huit et à seize ascospores ont le même nombre de chromosomes ; à savoir $n = 7$. Il est bon, en effet, d'avoir présents à l'esprit les résultats contradictoires qui furent obtenus par plusieurs auteurs dans la numération des chromosomes chez les *Neurospora*. Ainsi, Mc CLINTOCK (105) a trouvé $n = 7$ chez *N. crassa*. Par ailleurs, CUTTER (19) et COLSON (18) ont compté $n = 6$ chez *N. tetrasperma*.

De son côté, FINCHAM (59) étudiant cytologiquement *N. sitophila* et *N. tetrasperma* a trouvé $n = 7$ chez les deux espèces. Ce chiffre fut ultérieurement confirmé par DODGE, SINGLETON et ROLNIK (46).

Actuellement, on considère que le nombre haploïde de base est de $n = 7$ pour toutes les espèces de *Neurospora*.

L'examen des hyphes en croissance appartenant aux deux formes à huit et à seize ascospores de *Pl. decipiens* a permis de voir des mitoses, mais — en aucun cas — nous ne sommes parvenu à identifier les centrosomes. Il en résulte donc que la continuité de ces éléments n'a pas davantage été établie chez *Pl. decipiens* que chez *S. macrospora*. Toutefois, le centrosome est ici visible à partir de la diacinèse, alors qu'on ne pouvait l'apercevoir au plus tôt qu'en interphase II chez *S. macrospora*.

d) *Pleurage curvula* ET SA FORME *coronifera*

La forme *coronifera* diffère de *Pl. curvula* type essentiellement par la taille de ses ascospores et la présence de très longs poils agglutinés sur la partie supérieure des périthèces.

Au point de vue cytologique, nous n'avons pas trouvé de différence appréciable entre ces deux variétés, qui seront donc traitées ici conjointement. Comme pour les espèces précédentes, les asques prennent naissance par le mécanisme du crochet dangeardien. Les noyaux du jeune asque fusionnent ; l'asque renferme alors un unique noyau possédant un gros nucléole. A ce stade on observe, en général, contre la membrane nucléaire et à son intérieur, plusieurs corps fortement colorés dont la nature n'a pas été identifiée (Pl. 12, fig. 3).

Les chromosomes se contractent progressivement jusqu'au stade de la métaphase I. A ce moment, on peut observer sept bivalents, situés dans la région médiane du fuseau, dont les pôles sont occupés par deux centrosomes en bâtonnets légèrement incurvés qui sont ici très nets. Dans les cas les plus favorables, on constate que les fibres fusoriales se rattachent directement aux centrosomes et qu'il n'en existe aucune qui ne satisfasse à cette règle (Pl. 12, fig. 4).

En anaphase I, les bivalents se disjoignent en leurs éléments constituants qui gagnent les pôles. En interphase I, les centromères des différents chromosomes sont appliqués étroitement contre les centrosomes. On assiste au clivage des centrosomes dont les moitiés s'éloignent l'une de l'autre en direction longitudinale. Les chromosomes se contractent et se disposent en deux plaques équatoriales. C'est la métaphase II.

En interphase II, on assiste au remaniement, déjà signalé, de la position des centrosomes, qui viennent occuper la région médiane de l'asque alors que les noyaux proprement dits sont rejetés vers le haut et vers le bas (Pl. 12, fig. 5).

Dans le cas où l'asque s'est trouvé quelque peu écrasé par pression sur la lamelle, on distingue avec une remarquable netteté la structure des quatre noyaux : le centrosome apparaît comme un bâtonnet contre lequel sont intimement accolés les centromères de tous les chromosomes. De là, les bras des chromosomes divergent en direction du nucléole.

Viennent ensuite la métaphase III, l'anaphase III et la télophase III. L'asque comporte alors huit noyaux possédant chacun son centrosome. Ces derniers s'éloignent de leurs noyaux respectifs et la délimitation des ascospores se produit comme il a été indiqué chez *Pl. decipiens*.

Dans la jeune spore uninucléée, une mitose supplémentaire conduit à la formation de deux noyaux, dont l'un émigre dans l'appendice primaire qui s'isole ensuite, par une paroi, de la spore proprement dite.

e) *Pleurage fimiseda*

La formation des asques et le déroulement de la méiose sont conformes à ce qui a été décrit précédemment pour *Pl. decipiens* et *Pl. curvula*.

En métaphase I, on observe aux pôles du fuseau des centrosomes en forme de bâtonnets incurvés. Sur la place équatoriale, on dénombre sept bivalents.

Les centrosomes restent visibles en interphase I, II et III. On peut les voir facilement se cliver et gagner les pôles du fuseau.

Ainsi se constitue un asque renfermant huit noyaux ayant chacun son centrosome.

Le mécanisme de délimitation des ascospores est particulièrement net dans cette espèce. Les centrosomes se déplacent en direction de la base de l'asque et s'éloignent ainsi de leurs noyaux respectifs. La distance qui sépare le centrosome de son noyau est considérable puisqu'elle atteint quatre diamètres nucléaires (Pl. 13, fig. 1). Toutefois, il est visible que chaque centrosome reste uni à son noyau par une zone de cytoplasme différencié qui se colore plus intensément que le cytoplasme voisin.

A ce moment, les spores se délimitent graduellement à partir du centrosome, le noyau se trouvant englobé dans le cône de cytoplasme différencié qui en émane. Pendant longtemps encore, après le complet achèvement de la délimitation des ascospores, le centrosome peut être aperçu à l'extrémité du futur appendice primaire. Il semble bien qu'il se clive, car il apparaît comme une structure double (Pl. 13, fig. 2). Peut-être est-ce en préparation de la dernière mitose qui a lieu dans la spore et qui donne deux noyaux dont l'un passe dans l'appendice primaire, puis dégénère.

Cette observation confirme le rôle directeur du centrosome dans la délimitation des ascospores et montre bien qu'il est également responsable de la polarité de ces dernières.

f) *Pleurage setosa*

Cette espèce est particulièrement intéressante, car ses asques renferment cent vingt-huit ascospores.

La formation des asques est conforme au schéma classique du crochet dangeardien. Le noyau de fusion du jeune asque subit ensuite la méiose.

En métaphase I, nous avons compté six bivalents disposés en plaque équatoriale, les deux pôles du fuseau étant occupés par un centrosome en bâtonnet très net. A tous les stades métaphasiques ultérieurs, à savoir en M - II (2 plaques), M - III (4 plaques), M - IV (8 plaques), M - V (16 plaques), M - VI (32 plaques), M - VII (64 plaques), nous avons retrouvé les centrosomes situés aux pôles de chaque fuseau de division (Pl. 13, fig. 3).

De même, au cours de toutes les interfases : I, II, III, etc..., nous avons suivi le centrosome, point d'agrégation des centromères, et d'où divergent, à l'intérieur du noyau, les bras chromosomiques. Nous avons pu suivre également le clivage des centrosomes à ce moment (Pl. 13, fig. 4).

A partir du stade à seize noyaux, ceux-ci ne sont plus répartis d'une façon uniforme à l'intérieur de l'asque, mais sont distribués exclusivement dans une couche de cytoplasme périphérique, située immédiatement au contact de la membrane.

Lorsque l'asque renferme cent vingt-huit noyaux, les ascospores se délimitent par un mécanisme identique à celui qui a été décrit précédemment. Puis le noyau de la spore subit une mitose supplémentaire et l'un des deux noyaux fils émigre dans le futur appendice primaire. Cette dernière mitose a été observée antérieurement par M. et M^{me} MOREAU (109).

g) *Pleurage minuta*

Cette espèce comporte deux formes distinctes, dont les asques renferment respectivement huit et quatre ascospores. Etudions-les successivement :

1. — Chez la forme à huit spores, les asques prennent naissance par le mécanisme du crochet. Les deux noyaux du jeune asque fusionnent. A ce moment, l'asque renferme un unique noyau avec un gros nucléole. La membrane nucléaire semble particulièrement épaisse et est très visible à ce stade (Pl. 14, fig. 1).

Les chromosomes s'apparient et les bivalents formés se contractent jusqu'à arriver au stade de la métaphase I. Ils sont alors disposés en plaque équatoriale et les deux pôles du fuseau sont occupés par un centrosome en forme de bâtonnet. Il n'a pas été possible de déterminer si le nombre de bivalents est de six ou de sept. Le fuseau de 1^{re} division est longitudinal.

En interfase I, on retrouve les centrosomes à partir desquels divergent les bras chromosomiques. D'abord placés aux pôles du fuseau de la précédente division, leur disposition se modifie et les centrosomes viennent occuper la région médiane de l'asque, alors que l'un des noyaux se place vers sa base et l'autre vers son sommet (Pl. 14, fig. 2).

Les fuseaux de 2^e division sont aussi longitudinaux.

En interfase II, un changement de position comparable à celui observé en interfase I affecte les centrosomes : on les trouve dans la région médiane de l'asque. Ils se clivent et les deux moitiés s'éloignent en direction transversale (Pl. 14, fig. 3).

En télophase III, l'asque contient huit noyaux pourvus chacun de leur centrosome. La délimitation des ascospores ne tarde pas à intervenir. A partir de chaque chromosome, une masse de cytoplasme est progressivement délimitée et englobe le noyau correspondant (Pl. 14, fig. 4, 5). Cette masse

cytoplasmique se déforme, s'allonge, et le centrosome reste parfaitement visible à l'extrémité du futur appendice primaire. Il affecte alors la forme d'un croissant (Pl. 15, fig. 1).

Ultérieurement, la partie antérieure des ascospores se renfle et elles prennent alors leur forme caractéristique en massue (Pl. 15, fig. 2).

Il semble que le noyau qu'elles renferment subisse une mitose supplémentaire, l'un des deux noyaux passant dans l'appendice primaire. Toutefois, nous ne sommes pas parvenu à voir cette mitose.

2. — Chez la forme à quatre spores, il n'y a pas de différence appréciable dans le déroulement des phénomènes jusqu'au stade où l'asque renferme quatre noyaux. En particulier, les fuseaux de 2^e division se suivent dans l'asque, sans empiètement. Les centrosomes qui, comme précédemment, viennent occuper la région médiane de l'asque, se clivent et leurs deux moitiés partent en direction transversale.

La division nucléaire qui suit donne un asque renfermant huit noyaux et huit centrosomes. C'est alors que, préalablement à toute délimitation des ascospores, on constate que les huit centrosomes se rapprochent par paires (Pl. 15, fig. 3). Il n'est pas facile, en raison des déplacements nucléaires dont l'asque est le siège, de dire quelle est l'origine des centrosomes associés dans chaque paire. Nous inclinons à penser que les centrosomes qui s'apparient sont d'origine différente, c'est-à-dire proviennent de deux fuseaux distincts, mais voisins, de la division précédente (3^e division).

A ce moment, chaque centrosome semble se diviser, car il apparaît comme une structure double. La formation des ascospores intervient peu après. A partir de chaque groupe de deux centrosomes, une masse de cytoplasme est progressivement délimitée. Cette masse englobe les deux noyaux correspondants. Ainsi se constituent quatre ascospores binucléées, chaque noyau renfermant un nucléole très visible (Pl. 15, fig. 4). On rencontre assez fréquemment des anomalies dans la formation des ascospores, par exemple cinq ascospores dont trois binucléées et deux uninucléées (Pl. 15, fig. 5). De tels faits ont été signalés antérieurement par PAGE (119).

Mais, dans la grande majorité des cas, il est manifeste que les centrosomes appariés coopèrent dans la délimitation d'ascospores binucléées.

h) *Pleurage anserina*

Les asques de cette espèce contiennent quatre ascospores. Nous nous sommes assuré que les asques étaient formés par le mécanisme du crochet. Après la fusion nucléaire, l'asque renferme un seul noyau pourvu d'un gros nucléole.

L'appariement des chromosomes a lieu, puis les bivalents formés se

contractent. On arrive ainsi au stade de la métaphase I. Sur l'équateur du fuseau, on trouve sept bivalents bien nets, l'un étant nettement plus gros que les autres. Les centrosomes, présents aux deux pôles du fuseau, ne sont que difficilement visibles. Toutefois, on arrive à les mettre en évidence dans des préparations surcolorées.

La montée aux pôles des bivalents en anaphase I s'effectue en direction longitudinale. En interphase I, les deux noyaux montrent des filaments de chromatine polarisés en un point, mais les centrosomes ne sont que très peu visibles en cet endroit.

Viennent ensuite la métaphase II, puis l'anaphase II, dont les fuseaux sont orientés longitudinalement, l'un au-dessus de l'autre, et sans empiètement (Pl. 16, fig. 1).

En interphase II, on retrouve la disposition classique. Chaque noyau possède un centrosome et les bras des chromosomes divergent à partir de ce point, à l'intérieur de la cavité nucléaire (Pl. 16, fig. 2).

Les centrosomes se clivent à ce moment et partent en direction transversale ou oblique. Les chromosomes se contractent et se disposent en plaques métaphasiques, à égale distance de leurs centrosomes respectifs, qui ont gagné les pôles du fuseau. C'est la métaphase III. Les quatre plaques sont groupées deux par deux, respectivement dans la moitié supérieure et inférieure de l'asque (Pl. 16, fig. 3). Il est clair que chaque groupe de deux plaques correspond aux deux noyaux issus de la division précédente.

En anaphase III, les chromosomes se clivent et leurs moitiés gagnent les pôles (Pl. 16, fig. 4). En télophase III, l'asque renferme donc huit noyaux, quatre dans sa moitié supérieure et quatre dans sa moitié inférieure (Pl. 16, fig. 5).

A ce moment interviennent des modifications dans les positions respectives des noyaux et des centrosomes. On peut voir les centrosomes se rapprocher en formant quatre paires. Pour autant qu'on puisse en juger, les deux centrosomes constituant une paire sont d'origine distincte, c'est-à-dire que l'un d'entre eux provient d'un fuseau de la 3^e division et l'autre du fuseau voisin.

Cet appariement des centrosomes précède immédiatement la formation des ascospores. A partir des deux centrosomes accouplés, une masse de cytoplasme s'isole et englobe les deux noyaux correspondants. Cette masse cytoplasmique prend progressivement une forme de massue (Pl. 17, fig. 1) dont les deux centrosomes occupent la base, futur appendice primaire de l'ascospore.

Les anomalies dans la formation des ascospores sont assez fréquentes. Il s'agit, ou bien d'aberrations de polarité, certaines ascospores ayant leur appendice primaire dirigé vers le sommet de l'asque, ou bien de varia-

tions dans le nombre de spores et, par conséquent, dans le nombre de noyaux qu'elles renferment (Pl. 18, fig. 2, 3).

Un comptage effectué sur la souche que nous avons utilisée dans notre étude, cultivée à $t = 24^{\circ}\text{C}$, nous a donné les valeurs suivantes :

<i>Asques normaux</i>	<i>Asques présentant des aberrations de polarité</i>	<i>Asques présentant des modifications du nombre de noyaux par spore</i>	<i>Asques présentant les deux types d'aberrations</i>
107	14	11	1

Soit un pourcentage global d'asques anormaux de $26/133 = 19,5$. Bien entendu, ce chiffre n'est valable que pour la souche considérée et la température de 24°C . RIZET et ENGELMANN ont en effet montré (138) que le pourcentage d'anomalies varie beaucoup selon la souche et la température.

Plus tard, au moment où la paroi des ascospores commence à se charger en pigment, les deux noyaux subissent une mitose supplémentaire. En général, cette mitose n'est pas simultanée pour toutes les ascospores d'un même asque (Pl. 17, fig. 4). Quoi qu'il en soit, des quatre noyaux ainsi formés, trois demeurent dans la partie renflée, destinée à devenir la spore proprement dite. Le quatrième noyau émigre dans l'appendice primaire, qui s'isole ensuite par une membrane transversale (Pl. 18, fig. 1), puis le quatrième noyau dégénère et l'appendice primaire reste hyalin.

Cette mitose et la migration nucléaire qui la suit ont déjà été observées antérieurement par M. et M^{me} MOREAU (109).

En outre, nos observations concordent avec celles, très incomplètes, de WOLF¹ (172) et celles de DOWDING (48).

Sur le plan génétique, *Pl. anserina* a fait l'objet d'une étude détaillée de RIZET et ENGELMANN (138). S'appuyant sur les résultats des ségrégations observées par eux dans les asques, pour divers caractères, ces auteurs ont abouti aux conclusions suivantes :

« Dans l'asque, à la mitose homéotypique, les fuseaux sont superposés (sans chevauchement) et les quatre noyaux issus de la méiose ne subissent aucun mouvement nucléaire de nature à changer leur ordre avant la 3^e mitose. Chaque spore englobe deux noyaux non frères, fils des deux noyaux du stade tétranucléé inclus dans le même demi-asque ; les deux spores d'un même demi-asque sont génétiquement identiques. »

Il est facile de voir que nos propres conclusions confirment celles de RIZET et ENGELMANN.

i) *Pleurage zygospora*

Cette espèce présente un caractère très particulier : en effet, ses asques renferment huit spores doubles. Chaque ascospore est constituée par deux

parties noires renflées, ressemblant beaucoup à une ascospore d'une autre espèce de *Pleurage*, reliées l'une à l'autre par un très long tube (atteignant 150 μ). Ce tube n'est autre que l'équivalent de l'appendice primaire.

Les asques se forment par le mécanisme du crochet dangeardien. Après fusion des deux noyaux, l'asque renferme un unique noyau possédant un gros nucléole. Ce noyau est entouré généralement de corps en forme de calotte ou de croissant dont nous n'avons pu préciser la nature.

En métaphase I, on peut compter six bivalents, mais les centrosomes ne sont pas visibles aux pôles du fuseau.

Les centrosomes ne sont identifiables avec certitude qu'à partir de l'interphase II. Dans les quatre noyaux, une polarisation de la chromatine est très nette à ce stade. Tous les centromères des chromosomes sont groupés contre le centrosome, en forme de bâtonnet. On le voit se cliver et les deux moitiés se séparer, réunies entre elles par une masse amorphe.

Finalement, en télophase III, l'asque renferme huit noyaux et huit centrosomes. La délimitation des ascospores se produit sous l'action de ces derniers et de la même façon que chez les espèces précédemment étudiées. Malheureusement, dès que la spore est formée, il n'est plus possible de voir les centrosomes.

Les jeunes spores ont une forme grossièrement losangique. Leurs deux extrémités s'allongent considérablement, sans que le diamètre de la spore varie de façon appréciable (Pl. 24, fig. 3, 4). Puis les deux extrémités se renflent en massue. Une cloison apparaît à la base de chaque portion terminale renflée. Ainsi se trouvent délimitées deux « demi-spores » dont la paroi se charge de pigment et devient noire. Le boyau intercalaire, qui demeure hyalin, est l'équivalent de l'appendice primaire.

L'étude de l'évolution nucléaire dans la spore en croissance se trouve considérablement gênée par la présence de très grandes vacuoles qui encombrement le cytoplasme. CL. MOREAU (110) décrit ces inclusions cytoplasmiques comme des globules d'huile. Dans notre matériel, fixé dix jours au moins dans le Carnoy, ces globules ont disparu, mais à leur place se trouve une vacuole.

Nos observations sont en accord avec celles de LEWIS (89). Cet auteur a signalé qu'au cours de la croissance de la spore en longueur, le noyau qu'elle contient se divise. D'autres divisions ont lieu ultérieurement et la spore renferme alors un certain nombre de noyaux libres. A ce moment, des cloisons transversales peuvent se former. A ce propos, chaque périthèce renferme deux types d'asques. Dans le premier type, des cloisons transversales se forment, qui découpent la spore en segments uninucléés. Les parties terminales renflées peuvent elles-mêmes comporter deux noyaux ou davantage et se cloisonner (Pl. 24, fig. 5).

Dans le deuxième type d'asque, deux cloisons seulement se forment qui isolent les deux parties terminales renflées, uninucléées, de l'appendice

primaire qui les relie. L'appendice primaire renferme en général plusieurs noyaux, mais ceux-ci dégèrent, comme dans le cas précédent.

A maturité, l'appendice primaire s'est désintégré et les deux demi-spores sont désormais indépendantes l'une de l'autre.

3. — CARACTERES COMMUNS AUX PRECEDENTES ESPECES

La formation des asques et leur évolution nucléaire ultérieure présentent un grand nombre de caractères communs, chez les diverses espèces de *Sordaria* et de *Pleurage* que nous avons étudiées.

Nous avons vu que l'asque est — dans tous les cas — produit par le mécanisme du crochet dangeardien, quel que soit le nombre des ascospores dans l'asque et, partant, quel que soit le nombre des mitoses la première division est toujours réductionnelle (mitose hétérotypique). Il n'y a pas de seconde réduction du nombre des chromosomes : le phénomène de brachyméiose que GWYNNE-VAUGHAN a cru observer chez un certain nombre d'ascomycètes n'existe pas ici.

Le nombre des chromosomes est, suivant les espèces, égal à $n = 6$ ou $n = 7$. Toutefois, étant donné les difficultés certaines que l'on rencontre dans ces numérations, il n'est pas impossible qu'en réalité toutes les espèces possèdent $n = 7$ chromosomes, comme c'est le cas dans le genre *Neurospora*.

Une différence morphologique importante qui sépare les deux genres *Sordaria* et *Pleurage* est l'existence d'un appendice primaire sur les ascospores de ces derniers. Par opposition, les ascospores des *Sordaria* en sont totalement dépourvues.

Mais le caractère commun aux deux genres qui nous semble le plus intéressant est la présence constante d'un centrosome. Si l'on s'en tient aux études cytologiques que nous avons réalisées et dont nous venons de résumer l'essentiel, il ne semble pas douteux que le centrosome a un rôle déterminant dans la délimitation des ascospores. Chez les *Pleurage*, il est manifestement responsable de la polarité des spores, car, quelle que soit la direction prise initialement par le centrosome au moment de la formation des spores, on le retrouve toujours à l'extrémité de l'appendice primaire. Les anomalies de polarité que nous avons signalées chez diverses espèces apportent donc une preuve particulièrement nette du rôle fondamental du centrosome à cet égard.

Dans cet ordre d'idées, une preuve complémentaire aurait pu être fournie par l'étude cytologique de *Pleurage Dagobertii*, qui présente ce caractère exceptionnel que les appendices primaires des ascospores sont toujours dirigés vers le sommet de l'asque. Il est à présumer que, dans ce cas, au stade de la télophase III, et préalablement à la délimitation des ascospores, le centrosome s'éloigne du noyau en direction apicale. Malheu-

reusement, cette espèce n'a été rencontrée qu'une seule fois par Cl. MOREAU (110) et il nous a été impossible de la retrouver.

Une deuxième fonction du centrosome, qui, *a priori*, ne semble pas aussi évidente que son action dans la délimitation des ascospores, est son rôle dans la formation du fuseau. Dans les périodes où le centrosome est visible, on constate qu'il se clive au cours des interphases. Les deux moitiés se séparent, mais demeurent réunies par une nappe de substance amorphe qui, à notre avis, pourrait bien représenter la substance fusoriale. Les deux centrosomes fils gagnent les pôles de ce fuseau en formation, et les chromosomes, après s'être contractés, se disposent dans le plan équatorial. L'anaphase suit ; les chromosomes gagnent les pôles et vont s'accoler étroitement contre chaque centrosome. Il semble qu'il y ait une sorte d'attraction entre le centrosome et les centromères de chaque chromosome ; cette hypothèse est confirmée par les configurations observées en interphase. A ce moment, les centromères de tous les chromosomes sont étroitement accolés contre le centrosome. Quant aux bras des chromosomes, ils divergent en cône à partir de ce point.

Or, il est bien établi que le centromère, point d'attache du chromosome sur les fibres fusoriales, constitue en quelque sorte l'organe moteur de ce dernier. Si, à la suite d'un accident, un chromosome a été brisé, les fragments dépourvus de centromère sont incapables de gagner les pôles ; ils demeurent sur le plan équatorial et finissent par dégénérer dans le cytoplasme.

Nous sommes donc conduit à considérer qu'il y a des rapports étroits entre centromères et centrosome. Ce dernier (peut-être en coopération avec les centromères) aurait pour fonction l'organisation du fuseau, préalable indispensable à tout mouvement anaphasique des chromosomes.

Il est utile de souligner les difficultés auxquelles se heurte cette conception. C'est, en premier lieu, que les centrosomes ne sont pas visibles pendant tout le cycle de développement des diverses espèces étudiées. En particulier, nous n'avons pas réussi à les voir dans les hyphes. Des mitoses typiques y ont lieu cependant et les mouvements anaphasiques des chromosomes sont parfaitement normaux.

En second lieu, si l'on se tourne vers les plantes supérieures, c'est un fait bien établi que ces organismes n'ont pas de centrosomes, et cependant des fuseaux typiques se constituent au moment des mitoses.

L'absence de centrosome identifiable dans les mitoses des hyphes de *Sordaria* et *Pleurage* ne constitue pas, à notre avis, un obstacle insurmontable à notre conception. En effet, le centrosome est un organite difficilement colorable. On ne peut le mettre en évidence ni par l'orcéine acétique, ni par la technique de Feulgen (ceci prouve d'ailleurs que cet élément ne renferme pas d'acide désoxyribonucléique, substance caractéristique des chromosomes). Par contre, le carmin de Belling constitue un

colorant satisfaisant pour l'étude du centrosome. Toutefois, il convient d'avoir présent à l'esprit le fait que toutes nos observations (sur préparations colorées) ont été réalisées en contraste de phase. Nous croyons pouvoir affirmer que, si l'examen en avait été fait sur un microscope ordinaire, le centrosome nous aurait probablement échappé.

Même dans ces conditions optima, nous croyons utile de faire remarquer que le stade auquel le centrosome devient visible varie beaucoup suivant les espèces. Chez *Pl. decipiens*, on l'identifie dès la diacinèse ; chez *Pl. curvula*, *Pl. fimiseda*, *Pl. setosa* et *Pl. minuta*, le centrosome n'apparaît qu'en métaphase I. Chez *Pl. anserina*, on peut également l'apercevoir en métaphase I, mais uniquement dans des préparations surcolorées, et avec les plus grandes difficultés. Enfin, chez *Pl. zygospora*, *S. macrospora* et *S. fimicola*, le centrosome n'apparaît avec certitude qu'en interphase II.

Que doit-on conclure de ces observations ? Faut-il admettre que le centrosome apparaît *de novo* chez chacune des espèces précédentes, à un stade déterminé de la méiose ? Pour notre part, nous nous refusons à une telle conclusion. Il nous semble beaucoup plus vraisemblable d'admettre que le centrosome est un organite permanent, difficilement colorable, qui ne devient identifiable avec netteté qu'à certaines phases du cycle de développement. Son absence apparente dans les mitoses somatiques des hyphes nous semble pouvoir être attribuée à deux causes : tout d'abord, les noyaux des hyphes sont beaucoup plus petits que les noyaux contenus dans l'asque, et il se peut que les centrosomes soient également d'une taille très inférieure. En second lieu, peut-être la colorabilité de ces derniers est-elle pratiquement nulle à ce moment.

Si nous comparons deux cas extrêmes, soit *Pl. decipiens* et *S. macrospora*, nous savons que le centrosome présente, chez ces deux espèces, d'évidentes analogies de comportement. Cependant, aucun centrosome n'est identifiable aux pôles du fuseau de métaphase I chez *S. macrospora*. Il nous semble fondé de conclure que le centrosome s'y trouve bien, mais sous une forme non colorable (ou très difficilement colorable). L'existence de cas intermédiaires (cf. *Pl. anserina*) ne fait que renforcer notre conviction.

Par ailleurs, si l'on se tourne vers d'autres Ascomycètes, on possède au moins un exemple où la permanence du centrosome a été établie, à la fois dans les mitoses et au cours de la méiose. Il s'agit du *Phyllactinia corylea*, dont l'étude cytologique a fait l'objet d'un remarquable travail de HARPER (80).

4. — ETUDE EXPERIMENTALE DES FONCTIONS DU CENTROSOME

Les conclusions que nous venons de formuler quant aux fonctions du centrosome, chez les espèces de *Sordaria* et de *Pleurage* que nous avons étudiées, ont reçu une confirmation expérimentale. Par des procédés que

nous décrirons ultérieurement, l'action des rayons X sur *Sordaria macrospora* nous a permis d'obtenir un grand nombre de mutations géniques. Chez certains de ces mutants, le déroulement de la méiose et le mécanisme de délimitation des ascospores sont fortement perturbés.

L'étude cytologique de trois de ces mutants s'est révélée particulièrement fructueuse. Nous allons exposer en détail les faits que nous avons observés.

a) MUTANT ir-I

Cette souche montre de fréquentes anomalies dans la délimitation des ascospores. Chaque bouquet d'asques est toujours fortement hétérogène, en ce sens que les asques qui le composent renferment un nombre très variable d'ascospores, en fait de une à huit. On remarque que plus le nombre d'ascospores dans chaque asque est réduit, plus leur taille est grande (Pl. 26, fig. 5, 6, 7, 8).

L'étude de la méiose chez la souche ir-I n'indique aucune différence appréciable dans son déroulement, jusqu'au stade de la télophase III. L'asque renferme alors huit noyaux pourvus chacun d'un centrosome.

Au lieu de se répartir dans l'asque de façon à peu près régulière, comme cela a lieu chez *S. macrospora* type, il n'est pas rare de rencontrer ici des groupes de deux, trois, quatre... noyaux. Les centrosomes correspondants sont eux-mêmes assez proches les uns des autres dans ces divers cas (Pl. 5, fig. 3).

On conçoit dès lors qu'au moment où les divers centrosomes délimitent chacun une masse de cytoplasme, ébauche de la future ascospore, la proximité de certains centrosomes se traduise par la formation d'une masse commune de cytoplasme qui, dans ce cas, englobe deux, trois, quatre... noyaux. Ainsi se constituent des spores géantes plurinucléées. Occasionnellement même, une seule ascospore se forme dans l'asque ; elle inclut les huit noyaux issus des trois divisions (Pl. 5, fig. 4).

Tous les types d'anomalies peuvent se rencontrer. Comme chez *S. macrospora* témoin, les huit noyaux subissent enfin une dernière division. Au total, l'asque renferme alors seize noyaux, dont la répartition dans les ascospores est extrêmement variable (Pl. 6, fig. 1, 2, 3, 4).

En définitive, l'étude cytologique du mutant ir-I nous montre toute l'importance de la position mutuelle des centrosomes au moment de la délimitation des ascospores. Si plusieurs centrosomes se trouvent alors très proches l'un de l'autre, ils coopèrent pour délimiter une unique ascospore.

C'est un fait que l'étude de certaines espèces de *Pleurage* nous avait déjà permis d'établir. En effet, chez *Pl. minuta* f. 4 spores et chez *Pl. anse-*

rina, nous avons signalé que les centrosomes s'appariaient en quatre paires, délimitant ainsi quatre ascospores.

Nous verrons plus tard de quelle façon le mutant *ir-I* peut être utilisé pour déterminer les relations de dominance de certains gènes (gènes commandant la couleur de l'ascospore, voir chap. III et VI).

b) MUTANT *sps-I*

C'est un deuxième mutant génique que nous avons obtenu, sous l'action des rayons X, chez *S. macrospora*. Ses asques renferment en général plus de huit spores ; leur nombre peut même atteindre seize dans certains cas (Pl. 27 et 28). Beaucoup de ces ascospores avortent et restent hyalines au lieu de se colorer en noir intense comme les spores normales viables.

L'étude de l'évolution de l'asque révèle qu'il prend naissance par le mécanisme du crochet. Mais cet asque demeure binucléé, la fusion des deux noyaux haploïdes qu'il contient au départ n'ayant pas lieu. Chacun de ces noyaux augmente de taille et montre la présence d'un gros nucléole. A l'intérieur de ces deux noyaux, et d'une façon simultanée, les chromosomes se contractent progressivement et se disposent en deux plaques métaphasiques. On peut dénombrer sept chromosomes dans chacune de ces plaques. Leur forme ne laisse aucun doute sur le fait qu'il s'agit d'univalents (Pl. 4, fig. 1, 2).

A chaque nucléole se trouve attaché un chromosome. Ce dernier est probablement porteur de l'organisateur nucléolaire.

A ce stade qui, bien entendu, n'a rien à voir avec une méiose, puisqu'il n'y a plus appariement des chromosomes, nous continuerons — pour la clarté de l'exposé — à donner le nom de métaphase I.

Au stade suivant que nous appellerons l'anaphase I, les univalents se clivent et leurs moitiés montent aux pôles. On observe donc deux anaphases simultanées correspondant à chacune des deux plaques M-I. Quatre noyaux se reconstituent.

Nous arrivons alors à ce qu'on peut qualifier d'interphase I. Les centrosomes sont, pour la première fois, identifiables dans l'asque. Ils sont au nombre de quatre, associés individuellement à chacun des quatre noyaux. On observe dans ces noyaux une polarisation nette de la chromatine, les centromères de chaque chromosome étant agglutinés contre les centrosomes. Ces derniers se clivent et les deux moitiés s'éloignent l'une de l'autre.

Dans chaque noyau, les chromosomes se contractent et se disposent en quatre plaques équatoriales dont les centrosomes occupent les pôles, c'est la métaphase II. L'anaphase II, puis la télophase II lui succèdent.

L'asque renferme alors huit noyaux et leurs huit centrosomes.

C'est à ce moment qu'intervient un phénomène tout à fait aberrant : les huit centrosomes exécutent une division supplémentaire. L'asque contient dès lors huit noyaux et seize centrosomes (Pl. 4, fig. 3).

Ce n'est qu'ensuite que la délimitation des ascospores se produit sous l'action des centrosomes. Etant donné qu'il y a seize centrosomes pour huit noyaux, on s'explique qu'il se forme en général plus de huit spores ; on observe ainsi, par exemple : huit spores nucléées + cinq spores sans noyau. Ces dernières restent hyalines, puis dégénèrent. En pratique, le nombre total d'ascospores par asque est souvent inférieur à seize (Pl. 4, fig. 4 ; Pl. 5, fig. 1). Deux raisons peuvent expliquer ce fait :

En premier lieu, deux centrosomes peuvent coopérer à la délimitation d'une seule spore qui est alors, en général, plus grosse que la normale. On observe d'ailleurs une très grande irrégularité dans la taille des ascospores chez le mutant sps-I.

En second lieu, il se peut que quelques-uns, parmi les seize centrosomes, dégénèrent sans délimiter d'ascospores.

Il est à noter que, dans certains cas, un ou deux noyaux ne sont pas englobés dans une spore et dégénèrent dans le cytoplasme.

Nous devons également mentionner quelques faits rares qu'il nous a été donné d'observer. Certains asques montrent un noyau unique qui résulte manifestement de la fusion des deux noyaux haploïdes initiaux. En métaphase I, ces asques montrent sept bivalents, mais il est — bien entendu — impossible de dire quel est leur sort ultérieur.

Par ailleurs, on observe parfois des asques géants comportant plus de seize ascospores (jusqu'à vingt-deux, dont plus de huit spores viables) (Pl. 5, fig. 2 et Pl. 32, fig. 3, 4).

Enfin, dans de rares asques, ayant au total moins de seize spores, il arrive de rencontrer plus de huit ascospores nucléées. En raison de leur faible fréquence, l'origine de ces deux derniers types d'asques n'a pu être élucidée. Il semble certain qu'il a dû se produire un certain nombre de mitoses surnuméraires.

Mais, en définitive, la preuve essentielle que l'étude cytologique du mutant sps nous apporte est que la délimitation des ascospores est induite par le centrosome qui se comporte ainsi comme un élément doué d'une certaine « autonomie » par rapport au noyau.

La question se pose de savoir si le centrosome est doué d'une véritable continuité génétique, comparable à celle possédée par un chromosome. C'est un problème sur lequel nous reviendons plus tard.

c) MUTANT as-I

Il s'agit d'un troisième mutant génique obtenu, sous l'action des rayons X, chez *Sordaria macrospora*.

Les asques renferment à la fois des spores avortées et des spores viables

(noires à maturité). Ces dernières sont nettement plus grosses que les ascospores normales.

Le nombre des spores viables dans un asque varie entre zéro et quatre (Pl. 29 et 30).

Les asques prennent naissance par le mécanisme du crochet. Les noyaux fusionnent. Le jeune asque renferme alors un unique noyau, pourvu — suivant les cas — d'un ou de deux nucléoles. Dans ce dernier cas, les nucléoles sont en général inégaux.

Les chromosomes se contractent, mais ils ne montrent aucune tendance à s'apparier et restent à l'état d'univalents. Il ne peut donc y avoir de véritable méiose.

En métaphase I, on observe quatorze chromosomes monovalents. Dans le cas où il n'existe qu'un seul nucléole, on constate que deux des quatorze chromosomes lui sont attachés (Pl. 7, fig. 1) en des points généralement distincts. A n'en pas douter, il s'agit des deux chromosomes porteurs de l'organisateur nucléolaire.

Quand il y a deux nucléoles, ceux-ci sont très souvent inégaux ; un chromosome est attaché à chacun d'eux.

Plus tard, chaque univalent se clive et les deux moitiés se rendent aux pôles (anaphase I). Toutefois, le fuseau fonctionne fréquemment de façon très anormale et, dans un pourcentage élevé de cas, il se reconstitue un noyau unique renfermant vingt-huit chromosomes.

A partir de ce stade, selon qu'il s'est formé ou non un noyau de restitution à la suite de l'anaphase I, les configurations observées varient et deviennent de plus en plus complexes. Suivant les cas, les anaphases peuvent se dérouler d'une façon à peu près normale ou avorter en conduisant à des noyaux de restitution.

Dès le stade binucléé, les centrosomes sont bien visibles. On peut les voir se cliver au cours des interphases. Certains des produits de clivage semblent perdre contact avec les noyaux et on les retrouve plus tard isolés dans le cytoplasme, à une distance des chromosomes qui est parfois considérable.

Il en résulte que — dans un nombre très grand d'asques — alors que des groupes de chromosomes se trouvent dépourvus de tout centrosome, certains centrosomes sont isolés dans le cytoplasme où ils continuent à se diviser indépendamment (Pl. 7, fig. 2, 3, 4 ; Pl. 8, fig. 1, 2, 3, 4).

Le point important est que les groupes de chromosomes ayant perdu leurs centrosomes sont incapables d'entrer en anaphase (comparer par exemple les fig. 3 et 4, Pl. 8). Ils se divisent sur place et il se forme des noyaux de restitution.

La perte de contact entre chromosomes et centrosomes peut n'être que partielle. On observe occasionnellement de petites plaques métaphasiques comportant un ou deux chromosomes, les deux pôles étant occupés par

un centrosome. Il semble bien que, dans ce cas, l'anaphase se produise. Elle donne naissance à des micronoyaux (Pl. 8, fig. 1).

Quand le nombre total de centrosomes atteint huit, la délimitation des ascospores a lieu. On observe à la fois des ascospores nucléées et anucléées (Pl. 9, fig. 1. 2, 3).

Le noyau inclus dans chaque ascospore subit ensuite une division mitotique supplémentaire.

De l'étude de ce mutant, il semble donc que nous puissions conclure que le centrosome (peut-être en coopération avec les centromères des divers chromosomes) est l'organisateur du fuseau, car, en son absence, tout mouvement anaphasique est supprimé.

En conclusion d'ensemble de l'examen cytologique des trois mutants is-I, sps-I, as-I, nous sommes fondé à considérer que le centrosome est responsable de l'organisation du fuseau et de la délimitation des ascospores. Ces conclusions s'identifient à celles que nous avons déjà antérieurement formulées, après étude de la méiose chez diverses espèces de *Sordaria* et de *Pleurage*.

Enfin, on ne peut manquer d'être frappé par les aberrations que présentent les souches sps-I et as-I. Chez la première, la fusion des deux noyaux du jeune asque n'a pas lieu. Chez la deuxième, la fusion se produit, mais les chromosomes ne s'apparient pas. Est-ce à dire que le centrosome joue un rôle dans ces deux importants phénomènes ? Etant donné qu'il n'a pu être mis en évidence à ces stades, il nous est impossible de nous prononcer sur ce point.

5. — LES RECHERCHES DE A. W. et P. F. POLLISTER SUR LE CENTROSOME

Les recherches effectuées par ces auteurs sur la spermatogénèse de certains escargots vivipares (126) ont abouti à des conclusions importantes que nous nous devons de rapporter et de discuter ici.

Chez ces escargots, deux sortes de spermatozoïdes sont formés : d'une part, des spermatozoïdes typiques n'ayant qu'un seul flagelle ; d'autre part, des spermatozoïdes atypiques, en général beaucoup plus gros, possédant de nombreux flagelles, mais dont la chromatine est très réduite.

Chez ces organismes, il a été parfaitement démontré par MEVES que les flagelles sont directement issus des centrosomes. Dans ces conditions, si les spermatozoïdes atypiques ont beaucoup de flagelles, c'est parce qu'ils possèdent de nombreux centrosomes, au lieu de l'unique centrosome du spermatozoïde typique.

MEVES avait supposé que ces centrosomes supplémentaires provenaient

d'une série de divisions des deux centrosomes normaux. S'appuyant sur des recherches antérieures de SCHRADER et de DARLINGTON (28), A. W. et P. F. POLLISTER font remarquer que les centrosomes surnuméraires peuvent avoir une tout autre origine. SCHRADER a signalé qu'il y avait, entre centrosome et centromère (organe moteur du chromosome), de grandes ressemblances dans la taille, la colorabilité et l'aspect dans les cellules vivantes. Elle a suggéré que centrosome et centromère sont des organites apparentés. Ultérieurement, DARLINGTON a émis l'hypothèse que centrosome et centromère sont des corps identiques qui ne montrent des différences de comportement qu'en raison du fait que, normalement, l'un est localisé dans le cytoplasme et l'autre dans le noyau, comme partie intégrante d'un chromosome.

A. W. et R. F. POLLISTER soulignent que, si centrosome et centromère sont identiques, on peut concevoir qu'un centromère puisse se détacher de son chromosome, passer dans le cytoplasme, et y jouer le rôle d'un centrosome. Dans de telles circonstances, le chromosome ayant perdu son centromère devrait se comporter comme un fragment chromosomique acentrique, incapable de gagner les pôles du fuseau en anaphase.

Chez les espèces d'escargots étudiées, le nombre de chromosomes est $2n = 18$. Les auteurs ont constaté que, dans les spermatocytes atypiques, l'appariement des chromosomes n'a pas lieu. Les chromatides-sœurs se clivent en prophase I, de telle sorte que, pendant tout le cours des divisions de maturation, la cellule renferme trente-six chromatides, au lieu des neuf bivalents rencontrés dans la spermatogénèse typique.

Sur ces trente-six chromatides, quatre semblent parfaitement normales : elles montent aux pôles régulièrement au cours des deux divisions. Les trente-deux chromatides restantes se comportent de façon aberrante à partir de la télophase I. Elles sont incapables de rejoindre les pôles au moment de la 2^e division. Elles finissent par dégénérer et par disparaître dans le cytoplasme. Tout se passe comme si ces trente-deux chromatides étaient dépourvues de centromères.

A. W. et P. F. POLLISTER ont établi le fait important que, dans chaque groupe de quatre spermatides, issues d'un unique spermatocyte primaire, le nombre de centromères manquants (trente-deux) est exactement le même que celui des centrosomes supplémentaires. Ainsi donc, pour chaque centrosome supplémentaire qui apparaît au cours de la spermatogénèse atypique, il y a un chromosome qui se comporte comme s'il était acentrique. Cette concordance constitue, aux yeux de A. W. et P. F. POLLISTER, la meilleure preuve de l'hypothèse que les centrosomes supplémentaires, dans la spermatogénèse atypique, ne proviennent pas de la division répétée des deux centrosomes initiaux comme MEVES le croyait. Ces centrosomes surnuméraires résulteraient de la transformation des centromères de trente-deux des trente-six chromatides.

Les deux auteurs font remarquer que, dans la spermatogénèse typique, le centrosome atteint sa taille maxima lorsqu'il se trouve au pôle du fuseau. Sa croissance a donc lieu lorsqu'il est dans cette position. Cette augmentation de taille serait le résultat d'un transfert de substance, en provenance de chaque centrosome, la contribution totale de tous les centrosomes étant suffisante pour doubler la taille du centrosome et lui permettre de se diviser en deux centrosomes-fils au cours de l'interphase suivante.

Une preuve de ce transfert leur semble être donnée par le fait que les deux demi-fuseaux se colorent d'une façon spéciale. Cette colorabilité particulière ressemble à celle des centrosomes et des centromères. Les auteurs concluent que ceci peut s'expliquer par un passage de substance des centromères vers le centrosome, le long du demi-fuseau.

Depuis longtemps, le mode de croissance et l'origine des centrosomes ont fait l'objet de nombreuses discussions. D'une part, il est prouvé que — dans de nombreux cas — les centrosomes sont issus par division de centrosomes préexistants. Ceci semble indiquer que le centrosome est un organe doué du pouvoir d'auto-reproduction, au même titre qu'un chromosome.

D'autre part, il existe des faits nombreux qui montrent qu'au contraire des chromosomes, un centrosome peut prendre naissance par un procédé autre que la division d'un centrosome préexistant. Ainsi, chez les fougères, de nombreux auteurs, et tout récemment M^{me} VAZART (162), ont établi que des centrosomes (= blépharoplastes) apparaissent brusquement au cours de la spermatogénèse, alors qu'on n'en rencontre pas dans les cellules somatiques.

La conception développée par A. W. et P. F. POLLISTER occupe en quelque sorte une position médiane entre ces deux interprétations opposées : continuité génétique stricte ou apparition *de novo* occasionnelle.

D'après les deux auteurs précédents, aucun centrosome n'est en fait capable d'auto-reproduction indépendante, au sens où un chromosome synthétise sa propre substance à partir des matériaux contenus dans le cytoplasme environnant. Toutefois, les centrosomes se comportent comme des éléments permanents, puisqu'à chaque division cellulaire leur volume est doublé par transfert de matériaux spécifiques en provenance des centromères. Mais ces matériaux sont en définitive synthétisés par les chromosomes.

Si donc il est établi que la substance constitutive des centromères peut être transférée aux centrosomes au cours de la mitose et si de nouveaux centrosomes peuvent apparaître par la transformation de centromères, il semble clair qu'on ne peut pas considérer les centrosomes comme doués d'un pouvoir indépendant d'auto-reproduction.

Selon A. W. et P. F. POLLISTER, il n'y a que deux méthodes qui permettraient d'établir, d'une façon indiscutable, que les centrosomes sont doués d'un véritable pouvoir d'auto-reproduction :

(1) Une preuve génétique, analogue à celles qui ont été données pour l'hérédité des plastes.

(2) Une preuve cytologique, établissant de façon non ambiguë que les centrosomes peuvent continuer à se multiplier en l'absence de tout matériel nucléaire.

A la lumière de ces conceptions, nous pouvons maintenant revenir au cas des Sordariacées. Même dans la souche as-I, qui est asynaptique au même titre que les spermatocytes atypiques décrits par les précédents auteurs, nous n'avons observé aucune transformation de centromère en centrosome. Nous avons, au contraire, constaté que des centrosomes qui ont perdu contact avec les chromosomes et se sont éloignés dans le cytoplasme de l'asque restent capables de se diviser indépendamment. Toutefois, le nombre de ces divisions restant limité à une ou deux, il ne nous est pas possible d'affirmer que les centrosomes sont doués d'un véritable pouvoir d'auto-reproduction. Bien plus, dans certains asques (Pl. 7, fig. 4, en bas) on trouve un nombre impair de centrosomes. Un examen attentif révèle que — dans ce cas — l'élément impair est un centrosome qui s'est probablement séparé des chromosomes depuis fort longtemps et en est très éloigné. Sa colorabilité est nettement plus faible que celle des autres centrosomes et il semble avoir perdu la faculté de se diviser. Ceci semble prouver que la capacité de division indépendante des centrosomes est étroitement limitée.

En ce qui concerne les rapports entre centromères et centrosomes, l'étude des Sordariacées nous semble apporter des précisions intéressantes. Nous savons qu'à partir de la fin des anaphases, les centromères de tous les chromosomes sont venus s'accoler étroitement contre les centrosomes. Nous savons aussi qu'à l'interphase suivante cet étroit contact persiste : le noyau interphasique est nettement polarisé, les bras chromosomiques divergent à partir d'un point où se trouvent groupés tous les centromères, en contact étroit avec le centrosome. C'est précisément à ce stade interphasique que le centrosome se clive et que ses deux moitiés s'éloignent l'une de l'autre.

Il est donc tentant de considérer que si le centrosome se clive, c'est que sa masse a augmenté par apport de matériaux en provenance des centromères qui lui sont accolés. On rejoindrait ainsi les conclusions formulées par A. W. et P. F. POLLISTER.

6. — LE CENTROSOME CHEZ LES SPHERIALES

Un des faits essentiels qui se dégage de notre étude cytologique des Sordariacées est sans nul doute la présence d'un centrosome et son rôle dans la formation du fuseau et la délimitation des ascospores.

Toutefois, l'existence même du centrosome ayant été mise en doute (81), il convient d'examiner en détail si des faits comparables à ceux que nous avons observés ont été signalés et décrits chez d'autres Ascomycètes de l'ordre des Sphérialés qui comporte, parmi beaucoup d'autres espèces, les *Sordaria* et les *Pleurage*.

Depuis la description du genre *Neurospora* par SHEAR et DODGE en 1927 (152), de très nombreuses études cytologiques lui ont été consacrées.

DODGE (30) a étudié les trois divisions successives dans l'asque de *N. tetrasperma*. Le matériel a été fixé par le mélange de Flemming dilué, puis coloré au moyen de la triple coloration de Flemming. En métaphase I, II et III, les pôles du fuseau sont occupés par une sorte de bâtonnet fortement coloré.

En télophase I et II, on constate que les noyaux ont une forme en poire et possèdent un long bec. En ce qui concerne plus spécialement la télophase II, la symétrie particulièrement nette des figures ne laisse aucun doute sur le fait que les noyaux dont les becs s'étendent en directions opposées sont des noyaux-fils. On constate alors que les noyaux se sont déplacés et que chaque extrémité de l'asque renferme deux noyaux non fils.

En télophase III, les becs des huit noyaux s'allongent et se recourbent à leur extrémité comme un manche de parapluie. Les raies astrales sont très fines et, pour cette raison, les détails de la délimitation des ascospores ne sont pas faciles à voir. Cependant, il n'est pas douteux que les centrosomes interviennent activement dans ce processus, de telle sorte que des noyaux voisins non fils coopèrent dans la délimitation des ascospores. Ainsi se forment quatre spores binucléées. Occasionnellement, il se forme quelques spores uninucléées.

WILCOX (170) a étudié, à l'aide des mêmes techniques, le déroulement de la méiose chez *N. sitophila*. Elle signale des centrosomes en bâtonnet aux pôles des fuseaux. En anaphase II, les deux fuseaux sont superposés sans empiètement. En télophase II, les quatre noyaux ont une forme de poire et se terminent par deux organites (centrosomes) ayant l'aspect de cornes. Les deux noyaux dans chaque moitié de l'asque sont des noyaux-fils, orientés symétriquement.

Au stade à huit noyaux, l'auteur indique que les raies astrales ne sont pas très visibles. Cependant, chaque noyau possède un bec long incurvé d'où partent des rayons très fins qui interviennent dans la délimitation

des ascospores. Du côté opposé au bec se forment, dans chaque spore, de nombreuses vacuoles.

COLSON (18) a repris l'étude cytologique de *N. tetrasperma*. Elle a confirmé la description donnée antérieurement par DODGE.

Mc CLINTOCK (105) a été la première à appliquer à l'étude de *Neurospora* la méthode à l'acéto-orcéine et à l'acéto-carmin. Elle a compté chez *N. crassa* $n = 7$ chromosomes et signalé que l'un d'entre eux possède un organisateur nucléolaire. A la suite de la fusion nucléaire, dans le jeune asque, les chromosomes se raccourcissent, puis s'apparient dans cet état d'extrême contraction. Les chromosomes s'allongent ensuite et l'on parvient au stade pachytène.

Mc CLINTOCK est parvenue à élucider la nature du bec que présentent les noyaux en télophase I, II et III (DODGE, 1927). En fait, cet aspect résulte de ce que tous les centromères des différents chromosomes sont étroitement accolés contre le centrosome en un point de la membrane nucléaire.

Elle a confirmé également le rôle des centrosomes et des fibres qui en sont issues dans la délimitation des ascospores.

LINDEGREN et RUMANN (98), CUTTER (20), FINCHAM (59), ont compté le nombre des chromosomes chez diverses espèces de *Neurospora*, et signalé la présence de centrosomes.

DODGE, SINGLETON et ROLNICK (46) ont étudié les effets cytologiques du gène E chez *Neurospora tetrasperma*. Sur un milieu spécial, la souche hétérozygote E/e forme des asques renfermant huit ascospores (au lieu de quatre dans la souche type e/e), l'homozygote dominant E/E reste stérile.

L'examen de la méiose dans la souche E/e révèle que les deux fuseaux de deuxième division sont superposés et n'empiètent pas l'un sur l'autre. Cependant, l'élongation des fuseaux finit par se traduire ensuite par un empiètement, et, en télophase II, chaque demi-asque renferme des noyaux non-fils. C'est une situation analogue à celle déjà décrite chez *N. tetrasperma* type. Cependant, ici, les centrosomes qui sont bien visibles ne coopèrent pas en télophase III. Il se délimite donc en définitive huit spores bien distinctes.

Dans un but de comparaison, les mêmes auteurs ont aussi étudié la méiose chez *N. sitophila*, espèce dont les asques renferment huit spores. Ils ont confirmé la description antérieurement donnée par WILCOX (170).

SINGLETON (153), utilisant la technique à l'acéto-orcéine et à l'acéto-carmin, a étudié la méiose chez *N. crassa*. Il a observé que les asques se formaient par le mécanisme du crochet. C'est l'avant-dernière cellule du crochet qui se développe en asque.

Avant leur fusion, les deux noyaux montrent une polarisation nette : des filaments de chromatine divergent à partir d'un point de la partie supérieure du noyau. En ce point, on peut également voir une masse sphérique ou bilobée se colorant très intensément.

Peu après la fusion nucléaire, les deux masses de chromatine se différencient en deux groupes de sept chromosomes. Ceux-ci sont fortement contractés. Ces quatorze chromosomes s'allongent, puis s'apparient.

En fin de prophase I, un fuseau se forme à l'intérieur de la membrane nucléaire. L'auteur n'est pas parvenu à voir les centrosomes à ce stade.

En interphase I, les centrosomes des sept chromosomes demeurent groupés près de la membrane nucléaire au point antérieurement occupé par le pôle du fuseau. Les bras chromosomiques s'allongent progressivement et s'étendent en direction de l'autre noyau.

En interphase II, la disposition des centrosomes est identique à celle observée en interphase I.

Le centrosome n'a pu être mis en évidence avant l'interphase II, et seulement dans les préparations colorées avec l'acéto-carmin. En interphase II, les centrosomes ont l'aspect de deux bâtonnets longs et légèrement incurvés, situés aux points où les centrosomes des différents chromosomes sont agrégés. Chacun se divise et, en prophase III, les deux moitiés se séparent et se rendent en des pôles opposés du noyau, au contact de la membrane de l'asque. Etant donné que les deux centrosomes sont initialement situés sur la ligne centrale de l'asque, chacun des produits de clivage doit se déplacer d'environ un quart de circonférence pour atteindre sa position finale en métaphase III.

A ce moment, l'apparence habituelle du centrosome est celle d'un bâtonnet coloré de $2,0\ \mu$ de long et $0,5\ \mu$ d'épaisseur, généralement incurvé. Toutefois, certaines figures révèlent que le centrosome est, en fait, un triangle équilatéral de $2,5\ \mu$ de côté et $0,5\ \mu$ d'épaisseur. Cette plaque est flexible car, dans certains cas, un ou plusieurs coins du triangle sont pliés, ou bien encore la plaque entière légèrement incurvée. L'un des côtés du triangle fait face au pôle du fuseau et les fibrilles de ce dernier sont attachées sur toute la longueur de ce côté.

En télophase III, les ascospores s'individualisent. Le processus est, dans ses grandes lignes, identique à celui décrit par HARPER chez les Erysiphasées. A partir de chaque centrosome partent des fibrilles qui délimitent une masse fusiforme de cytoplasme contenant le centrosome et le noyau auquel il est attaché. Puis une paroi hyaline apparaît à la surface de la masse ainsi délimitée.

Peu après la délimitation, le noyau prend une position centrale dans la spore. Quant au centrosome, il reste étroitement appliqué contre la membrane de la spore, à une extrémité.

SINGLETON discute en détail le comportement du centrosome. Il fait remarquer qu'entre la métaphase I et la métaphase III le centrosome subit une augmentation considérable de taille. La majeure partie de cette augmentation a lieu pendant la télophase II et l'interphase II, au moment où

le centrosome se trouve juste à l'extérieur de la membrane nucléaire, au contact des centromères agrégés de tous les chromosomes.

En interphase II, un examen attentif du centrosome en voie de clivage révèle qu'il a la forme de deux plaques triangulaires vues par un côté. Ces deux plaques se font face, mais s'écartent l'une de l'autre quand on va de la base vers le sommet. Il est probable que le plan de division du centrosome est parallèle à la face plane de la plaque triangulaire.

Il est impossible de dire si la forme triangulaire du centrosome ne fait son apparition qu'en interphase II. On sait qu'en métaphase I et II le centrosome a la forme d'un bâtonnet. SINGLETON exprime l'opinion qu'une étude attentive de ces « bâtonnets » indiquerait qu'en fait il s'agit, là encore, de plaques triangulaires vues de profil.

A la suite de la délimitation des ascospores, un processus de fragmentation ou de diminution du centrosome doit avoir lieu, car le centrosome qu'on peut voir en prophase IV est à nouveau un petit bâtonnet, alors que la plus grande partie du centrosome présent en anaphase III reste accolée contre la paroi de l'ascospore.

Enfin, l'auteur fait remarquer que chacun des deux noyaux de la cellule ascogène a probablement un centrosome. On peut alors se demander si chacun d'eux se retrouve aux pôles du fuseau de métaphase I ou si l'un dégénère, laissant place aux deux moitiés issues de l'autre.

Le genre *Gelasinophora* comporte des espèces dont les asques renferment soit quatre, soit huit ascospores. DODGE (39) a étudié la méiose chez *G. tetrasperma*.

En métaphase I, le fuseau est parallèle à l'axe et ses deux extrémités sont occupées par un centrosome. Des raies astrales divergent à partir de ce dernier.

En anaphase II, les deux fuseaux sont situés l'un au-dessus de l'autre, sans empiètement.

En interphase II, les quatre noyaux présentent un bec prolongé par un centrosome en forme de corne. Ces noyaux ressemblent ainsi beaucoup à ceux de *N. tetrasperma* au même stade. Toutefois, il existe une différence intéressante entre les deux espèces. Chez *N. tetrasperma*, les becs des deux noyaux supérieurs sont dirigés vers le sommet de l'asque et ceux des noyaux inférieurs pointent vers la base de l'asque. Au contraire, chez *G. tetrasperma*, les becs de la paire supérieure de noyaux pointent vers le bas et ceux de la paire inférieure vers le haut.

En télophase III, l'asque renferme huit noyaux en forme de poire. Chacun est prolongé par un bec à l'extrémité duquel se trouve le centrosome. De là partent une série de raies astrales. Comme chez *N. tetrasperma*, les centrosomes coopèrent deux par deux pour délimiter quatre ascospores binucléées.

FAULL (57), PIEHL (121), RITCHIE (135) ont étudié la formation des péri-

thèses et le déroulement de la méiose chez *Sordaria fimicola*. Ils ont identifié un centrosome qui joue un rôle dans la délimitation des ascospores. Nos propres conclusions sont en accord avec celles de ces trois auteurs.

DENGLER (29) a fait l'étude cytologique des trois espèces *Sordaria macrospora*, *S. Brefeldii* et *S. uvivola*. Il s'agit d'un travail assez rudimentaire. L'auteur semble avoir pris les nucléoles pour des noyaux.

GWYNNE-VAUGHAN et BROADHEAD (74) ont examiné l'espèce *Ceratostomella fimbriata*. Bien que les centrosomes ne soient pas mentionnés, ils figurent nettement dans leurs dessins.

POMERLEAU (127) a examiné l'espèce parasite *Gnomonia ulmea*. Au cours de la méiose, il signale la présence de centrosomes bien nets aux pôles des fuseaux de division. Lorsque l'asque renferme huit noyaux, la formation des ascospores intervient, le noyau prend la forme d'une poire dont l'extrémité supérieure est rattachée à un centrosome. De ce dernier part un aster dont les rayons encerclent le noyau. Par l'entremise de ces rayons, la délimitation de l'ascospore s'effectue alors, en commençant près du centrosome.

LUCAS (99) a étudié la méiose chez *Glomerella cingulata*. Il a employé comme fixateur le mélange faible de Flemming et comme colorant le violet de gentiane. Le déroulement de la méiose est conforme à ce qui a été observé chez *Neurospora crassa* et *N. sitophila*, mais aucun centrosome ni aster n'ont été observés par l'auteur. La façon dont les ascospores se délimitent n'a pas été étudiée.

STEVENS (160) s'est intéressé à *Dermatocarpon aquaticum*. A la méiose, on trouve des centrosomes aux pôles de tous les fuseaux de division. Leur forme est celle d'un petit bâtonnet parallèle au plan équatorial. Leur origine n'a pu être précisée, car ils ne sont pas visibles avant la métaphase I. Par ailleurs, l'auteur n'a pas réussi à les voir au cours des interphases. Il n'a pas vu d'aster et n'a pu suivre avec précision la délimitation des ascospores.

Enfin, chez *Chaetomium elatum*, M. et M^{me} F. MOREAU (112) ont observé un centrosome dans les jeunes asques. Ils pensent que ce centrosome joue un rôle dans la délimitation des ascospores.

7. — CONCLUSION D'ENSEMBLE

Au terme de cette revue bibliographique sur le centrosome chez les Sphéridales, nous pouvons formuler un certain nombre de conclusions importantes.

Nous avons constaté en effet que le centrosome a été mis en évidence chez presque toutes les espèces ayant fait l'objet d'une étude cytologique. Il semble partout présider à la genèse du fuseau et à la délimitation des ascospores.

Nos propres observations sur les genres *Sordaria* et *Pleurage* viennent ainsi s'intégrer dans un ensemble homogène. En outre, l'étude des mutants *ir-I*, *sps-I* et *as-I*, de *S. macrospora*, a précisé, par voie expérimentale, quelles étaient les fonctions du centrosome.

Toutefois, nous ne pouvons terminer ce chapitre sans discuter les conclusions opposées d'une importante étude sur le noyau des Ascomycètes récemment publié par M^{me} HEIM (81). Cet auteur a utilisé divers procédés de fixation et de coloration, en particulier : le fixateur de Helly, suivi par la réaction de Feulgen, et le fixateur de Navaschine, suivi par la coloration à l'hématoxyline ou au violet de Gentiane.

Discutant de l'existence du centrosome, M^{me} HEIM écrit : « Malgré de nombreuses observations faites sur des préparations que nous considérons comme les meilleures, nous n'avons jamais réussi à rencontrer d'images comportant cet énigmatique corpuscule (le centrosome), ni à déceler le mécanisme compliqué de la formation du fuseau achromatique. » « Certes, dans les objets colorés à l'hématoxyline ou au violet de Gentiane, nous avons parfois vu aux pôles du fuseau un ou deux granules, ou traits formant comme un disque concave. Mais en faisant varier la mise au point, nous nous sommes rendu compte soit qu'il s'agissait d'une illusion d'optique, ces granules extra-nucléaires se trouvant au contact du cytoplasme environnant et proches de l'extrémité du fuseau, soit qu'ils provenaient d'une coalescence due à la convergence des stries du fuseau. »

Et, plus loin, à propos de la formation des spores : « A aucun moment les noyaux n'esquissent de prolongement en bec. Ces noyaux sont libres dans le sporoplasme, aucun corpuscule ne les attachant à la paroi de l'asque. Aucune trace d'asters ne se montre autour des noyaux. »

Enfin, la conclusion ne prête à aucune équivoque : « Le fuseau apparaît d'emblée dans l'enchylème nucléaire sans le secours de centrosomes. Ces derniers ne sont visibles dans aucune figure cinétique... ni centrosomes, ni asters ne prennent part au processus aboutissant à l'organisation des spores. Ces dernières se forment par la fragmentation du cytoplasme sporogène en îlots renfermant chacun un noyau. »

Ces résultats s'expliquent aisément par le fait que le centrosome est un élément difficilement colorable. Comme nous l'avons déjà vu, GUILLIERMOND (72) a signalé que — dans un premier travail — il n'était pas parvenu à voir les centrosomes d'*Aleuria rutilans*, car, au cours de la différenciation, ces derniers se décolorent très facilement et avant les chromosomes.

En ce qui nous concerne, nous pouvons ajouter que les centrosomes nous auraient peut-être échappé si nous n'avions pas observé nos préparations en contraste de phase.

Les documents photographiques que nous présentons ne laissent place à aucun doute sur l'existence du centrosome chez les espèces de *Sordariacées* que nous avons étudiées.

CHAPITRE III

MUTATIONS INDUITES PAR LES RADIATIONS

Pour les raisons exposées précédemment, nous avons choisi l'espèce *Sordaria macrospora* Auersw. comme matériel d'étude pour l'induction de mutations par les radiations.

1. — TECHNIQUES

Seuls les rayons X ont été utilisés. Notre générateur est un appareil de faible puissance, émettant un rayonnement qui n'est pas monochromatique. Les différentes doses ont été obtenues en faisant varier la distance et la durée d'exposition.

Le matériel irradié a toujours consisté en carrés de gélose, contenant des hyphes, prélevés dans une culture témoin sur milieu de Dodge. La dose appliquée a varié entre 10.000 et 25.000 roentgen.

Le carré de gélose ainsi traité est découpé en fragments plus petits qui sont repiqués chacun dans une boîte de Pétri contenant 20 cm³ de milieu de Dodge stérile. Le mycélium pousse, envahit la boîte et des périthèces se forment en grand nombre à la périphérie de la culture. Deux procédés sont alors employés :

(a) Les périthèces mûrs, qui sont presque tous en surface du milieu, sont prélevés méthodiquement à l'aide d'un enseigneur, placés sur une lame dans une goutte d'eau et écrasés sous une lamelle. La préparation ainsi obtenue est alors soigneusement examinée sous la loupe binoculaire et au microscope.

Les bouquets d'asques présentant un caractère différent du type sont ensuite repiqués sur le milieu de Dodge à l'acétate de sodium (de façon à assurer le pourcentage maximum de germination des ascospores). Le jeune mycélium qui se développe est alors transféré dans un tube contenant du milieu de Dodge normal. Dès que la culture a fructifié, on y fait un prélèvement de périthèces dont le contenu est examiné. On peut ainsi s'assurer de l'homogénéité de la souche et voir si ces caractères continuent à être différents du type.

Si tel est le cas, la souche est considérée comme mutante. Elle est conservée et sera soumise plus tard à un ensemble de tests destinés à déterminer la nature du changement génétique qui est intervenu. Parfois, un bouquet est repiqué parce que ses asques montrent une disjonction et contiennent, par exemple, quatre spores noires et quatre spores blanches. Dans ce cas, la descendance est hétérogène et, s'il s'agit d'une mutation génique, comporte en particulier des bouquets d'asques dont les spores sont toutes blanches. Il suffit de repiquer un tel bouquet pour obtenir une culture pure du mutant. Deux étapes sont donc ici nécessaires.

(b) On attend que les cultures issues du fragment de gélose irradié aient fructifié. Aucun prélèvement de périthèces n'y est effectué. Lorsque les asques sont mûrs, ils expulsent avec violence les ascospores qu'ils contiennent. Celles-ci sont projetées au travers du col du périthèce et viennent se coller sur le couvercle de la boîte de Pétri.

Ce bombardement est très intense et, au bout de quelques jours, le couvercle de la boîte est revêtu intérieurement d'une couche d'ascospores mûres. Celles-ci sont — nous le savons — binucléées, mais les deux noyaux d'une spore sont génétiquement identiques. Par ailleurs, étant donné qu'elles proviennent d'hyphes irradiés, on peut s'attendre à ce que certaines d'entre elles comportent deux noyaux mutants. Il s'agit donc de réaliser des cultures monospores.

Au début, nous avons simplement prélevé des spores sur le couvercle de la boîte de Pétri, à l'aide d'une aiguille fine et sous le contrôle de la loupe binoculaire. Ces spores étaient repiquées d'abord sur le milieu de Dodge à l'acétate de sodium. Le jeune mycélium était ensuite transféré dans des tubes contenant du milieu normal de Dodge.

Cependant, l'expérience nous a appris que, dans ces conditions, une proportion importante des ascospores ne germe pas. C'est sans nul doute une conséquence directe de l'irradiation initiale.

Nous employons donc actuellement le procédé que nous allons décrire. Nous préparons une suspension d'ascospores en versant de l'eau stérile sur le couvercle de la boîte de Pétri. Cette suspension est placée dans un petit vaporisateur en verre, puis pulvérisé sur une série de boîtes de Pétri renfermant le milieu de Dodge à l'acétate de sodium, additionné de pénicilline et de streptomycine (de façon à éviter toute infection bactérienne accidentelle). On contrôle la densité des ascospores sous la loupe binoculaire.

L'opération est généralement faite le soir vers dix-huit heures et les boîtes sont laissées toute la nuit à la température du laboratoire. Le lendemain matin, les ascospores viables ont germé. Il suffit de les repiquer dans des tubes. Dans ces conditions, toute manipulation inutile, telle que le repiquage de spores non viables, est évitée.

Les tubes de cultures monospores sont placés à l'étuve à 28°C. Au bout

de huit à dix jours, ils renferment des périthèces mûrs. Il faut alors examiner chaque culture et y faire des prélèvements de périthèces. On peut ainsi voir si la souche présente des caractères différents du type.

Conformément aux conclusions tirées de l'étude cytologique de *Sordaria macrospora* type, les cultures mutantes rencontrées sont homogènes, ce qui est une conséquence de l'identité génétique des deux noyaux contenus dans l'ascospore.

Les cultures mutantes sont numérotées et soumises ultérieurement à des tests destinés à préciser la nature des modifications héréditaires qu'elles ont subies.

Il est à signaler qu'avec ce deuxième procédé une catégorie de mutants peut être d'emblée identifiée et isolée. Il s'agit des mutants différant du type par la vitesse de croissance ou la morphologie du mycélium.

2. — MUTANTS OBTENUS

La recherche de mutants par le premier procédé que nous venons de décrire révèle immédiatement que beaucoup de périthèces examinés renferment des asques contenant des ascospores avortées. Par comparaison, on ne trouve pratiquement pas de spores avortées dans les cultures types non irradiées.

Le pourcentage de périthèces de cette sorte varie selon la dose de rayons X appliquée, suivant une courbe sur laquelle nous reviendrons plus tard. Il nous suffit d'indiquer, pour l'instant, que cette proportion peut dépasser 50 %.

De toute évidence, ces spores avortées résultent des cassures et remaniements chromosomiques qui ont été induits par le rayonnement X.

Quant aux mutations géniques, elles sont — par opposition — très rares. Il est toujours nécessaire d'examiner le contenu de milliers de périthèces avant de découvrir un mutant appartenant à cette classe.

Nous allons passer en revue et décrire les mutants que nous avons obtenus. Les critères que nous avons utilisés pour établir qu'il s'agissait bien de mutations géniques ne seront exposés qu'ensuite.

a) MUTATIONS AFFECTANT LA COULEUR DES ASCOSPORES

Nous avons déjà signalé que le type sauvage de *S. macrospora* possède des ascospores noires. Nous avons obtenu un grand nombre de mutants où ce caractère est modifié, à savoir :

(1) Sept mutants, obtenus de façon indépendante, dont les ascospores sont blanches, à paroi mince et fragile, complètement dépourvue de pigment. Mises dans l'eau, ces ascospores éclatent. Elles sont néanmoins capa-

bles de germer parfaitement sur un milieu nutritif convenable, tel celui de Dodge.

De même, alors que la souche sauvage a la paroi de ses périthèces colorée en noir intense, ces sept souches ont une paroi blanche ou très faiblement jaunâtre.

Une comparaison attentive de ces sept souches ne révèle pas de différences morphologiques appréciables. Toutes fructifient abondamment, mais avec un ou deux jours de retard sur la souche sauvage.

Tous ces mutants ont été isolés par la méthode (a), la plupart à partir de bouquets en disjonction dont les asques renfermaient quatre spores noires et quatre spores blanches.

Ces souches ont été numérotées de 1 à 7. Nous les désignons globalement par le symbole bl_1 (= blanc) (Pl. 26, fig. 3).

(2) Un mutant à ascospores blanches, légèrement teintées de vert. La paroi des spores est mince. Leur germination sur milieu de Dodge est bonne.

La paroi des périthèces est blanc sale.

Cette souche a reçu le numéro 8, symbole bv_1 (= blanc verdâtre).

(3) Un mutant à ascospores beige clair, à paroi mince, de bonne germination. L'enveloppe des périthèces est beige.

Cette souche a reçu le numéro 9, symbole be_1 (= beige).

(4) Neuf mutants dont les ascospores sont jaune clair. Leur germination est bonne.

Ces neuf mutants ont été obtenus de façon indépendante par la méthode (a), la plupart à partir de bouquets en disjonction, dont les asques contenaient quatre spores noires et quatre spores jaunes. Certains d'entre eux sont toutefois directement issus de bouquets d'asques homogènes à spores jaune clair.

Par suite de déficiences biochimiques que nous n'avons pas précisées, ces souches ne montrent que des ébauches de périthèces qui n'évoluent pas jusqu'à la formation d'asques, et ceci quel que soit le milieu de culture (milieu de Dodge ou fumier de cheval frais stérilisé).

Cependant, en culture mélangée avec la souche sauvage (à spores noires), on obtient en abondance des bouquets d'asques hybrides, chaque asque de ce type renfermant quatre spores noires et quatre spores jaunes. On obtient aussi un petit nombre de bouquets d'asques homogènes à spores jaunes.

Ces neuf mutants ont une vitesse de croissance légèrement inférieure à celle de la souche sauvage. Ils ont tous la propriété de colorer en jaune pâle le milieu de culture.

Ces souches, qui sont indistinguables, ont reçu les numéros de 10 à 18. Elles sont collectivement désignées par le symbole j_1 (= jaune).

(5) Huit mutants dont les ascospores sont jaune foncé. La germination de ces spores sur le milieu de Dodge est bonne.

Contrairement aux souches précédentes (à spores jaune clair), celles-ci fructifient normalement, leur vitesse de croissance est un peu inférieure à celle de la souche sauvage.

La paroi des périthèces est jaune très foncé.

On ne peut distinguer ces huit souches les unes des autres. Nous leur avons donné les numéros de 19 à 26. Elles sont désignées par le symbole j_2 (= jaune).

(6) Trois mutants dont les ascospores sont jaune doré. Ces spores germent bien et la fructification s'effectue normalement.

Il semble exister de légères différences entre ces trois souches. Nous les avons numérotées de 27 à 29.

(7) Neuf mutants, obtenus de façon indépendante, dont les ascospores ont une couleur rose foncée.

Une fois de plus, la germination des ascospores est bonne et la fructification s'effectue normalement.

Ces neuf souches ne présentent pas de différences notables. Leur vitesse de croissance est inférieure à celle du type sauvage à spores noires.

Les périthèces sont colorés en rose foncé, un pigment rose s'accumule, à la longue, dans le milieu de culture.

Ces souches ont reçu les numéros 30 à 38. Elles sont désignées par le symbole r_1 (= rose) (Planche 26, fig. 4).

(8) Un mutant à ascospores rose violacé. C'est le numéro 39, symbole rv (= rose violacé).

(9) Deux mutants indépendants, à ascospores rose pâle. La germination de ces dernières est bonne et les souches fructifient normalement.

La paroi des périthèces a une teinte rose foncé.

Ces deux mutants ne montrent pas de différence appréciable. Ils ont reçu les numéros 40 et 41. Le symbole r_2 (= rose) leur a été conféré.

(10) Quatre mutants à ascospores vert olive. Ces quatre mutants numérotés de 42 à 45 diffèrent les uns des autres, non par la teinte des ascospores qui est absolument identique, mais par le mode de croissance. En effet, alors que les souches 42, 43 et 44 fructifient normalement, la souche 45 a une croissance lente et irrégulière. Elle ne forme pas de périthèces en culture pure, quel que soit le milieu.

A ces quatre mutants nous avons donné le symbole vo_1 (= vert-olive).

(11) Dix mutants à ascospores violettes, numérotés de 46 à 55. Ils ont été obtenus de façon indépendante.

La germination des ascospores et la fructification des cultures sont bonnes. Ces dix souches ne diffèrent pas les unes des autres de façon appréciable. Symbole vi_1 (= violet).

(12) Un mutant dont les ascospores ont une couleur beige verdâtre. C'est la souche n° 56.

Elle ne forme pas de périthèces en culture pure. Symbole v_1 (= vert).

(13) Un mutant à ascospores vert-olive. Leur teinte diffère de celles des spores des souches 39, 42, 43, 44, 45, 46.

La germination des spores sur le milieu de Dodge et la fructification des cultures sont bonnes. Symbole vo_2 (= vert-olive, deuxième type).

Contrairement aux cinquante-six souches précédentes, qui se sont révélées d'une parfaite stabilité et n'ont jamais montré de mutation réverse vers le type sauvage à ascospores noires, cette souche (n° 57) est caractérisée par une instabilité extrêmement marquée. Il est pratiquement impossible d'avoir une culture pure. Les asques formés par ce mutant sont de trois types : certains renferment huit spores vertes, d'autres quatre spores noires et quatre spores vertes, d'autres enfin — beaucoup plus rares — ont huit spores noires.

Il en est ainsi, même si l'on a pris soin de constituer une culture à partir d'une seule ascospore verte, ne renfermant, au départ, qu'un seul type de noyau, le type mutant.

Compte tenu du fait (démonstré plus loin) que la souche n° 57 ne diffère du type sauvage que par un seul gène, il est clair que les faits précédemment exposés ne peuvent s'expliquer que par une instabilité très marquée du gène mutant. Celui-ci se transforme spontanément en l'allèle sauvage correspondant avec une très grande fréquence.

(14) Un mutant dont les ascospores sont beige-foncé. C'est la souche n° 58. Elle a été obtenue par la méthode (a) à partir d'un bouquet homogène à spores beiges.

La germination des ascospores et la fructification de la souche sont normales. Symbole : bf (= beige foncé).

Au total, par conséquent, cinquante-huit mutants distincts ont été isolés, dont les ascospores diffèrent par leur couleur des ascospores de la souche sauvage.

b) MUTATION AFFECTANT LA DISPOSITION DES ASCOSPORES DANS L'ASQUE

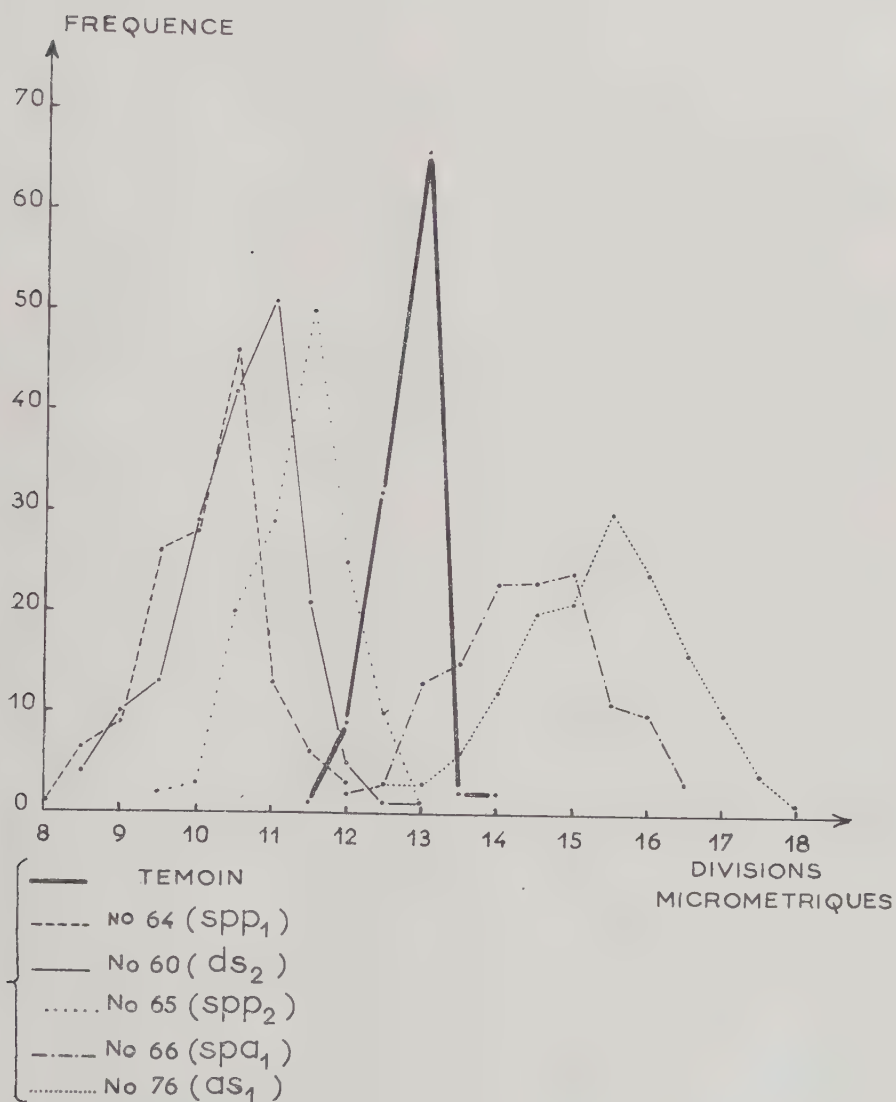
Nous avons déjà indiqué que chez tous les *Sordaria* (et en particulier chez *S. macrospora*) les huit ascospores sont disposées linéairement dans l'asque.

TABLEAU 1.-
LONGUEUR DES ASCOSPORES DE SORDARIA MACROSPORA TYPE ET DE
CERTAINS DE SES MUTANTS

GRADUAT. MICROM. SOUCHE	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11	11,5	12	12,5	13	13,5	14	14,5	15	15,5	16	16,5	17	17,5	18	18,5	19	LONGUEUR MOYENNE EN μ	
TEMOIN								1	9	32	66	2	2											21,2	
No 60 (ds ₂)		4	10	13	29	42	51	21	5	1	1													17,5	
No 62 (ds ₃)							7	16	13	28	21	23	6											20,8	
No 64 (spp ₁)	1	6	9	26	28	46	13	6	3															16,8	
No 65 (spp ₂)				2	3	20	29	50	25	10	1													18,8	
No 66 (spa ₁)									2	3	13	15	23	23	24	11	10	3						23,9	
No 76 (ds ₁)											3	3	6	12	20	21	30	24	16	10	4	1	2	2	26,3

1 GRADUATION MICROMETRIQUE $\equiv 1,66 \mu$

TABLEAU 2. LONGUEUR DES ASCOPORES
DE SORDARIA MACROSPORA TYPE ET
DE CERTAINS DE SES MUTANTS



Nous avons cependant obtenu plusieurs mutants dont les ascospores sont en désordre ou disposées sur deux rangs, à savoir :

(1) Mutant n° 59 : il a des asques ovoïdes et les ascospores sont en désordre (Pl. 25, fig. 3, 4). La taille et la forme de ces dernières ne diffèrent pas de celles de la souche sauvage.

Ce mutant a été isolé par la méthode (a) à partir d'un bouquet homogène d'asques dont les spores étaient en désordre. Symbole : ds_1 (= désordre premier type).

(2) Mutants n°s 60 et 61 : alors que les ascospores de la souche sauvage ont une forme elliptique, ces mutants ont des ascospores rondes (tableaux 1 et 2). En outre, au lieu d'être alignées, elles sont disposées sur deux rangs (Pl. 25, fig. 5, 6).

La vitesse de croissance de ces mutants est presque identique à celle du type sauvage. Le pourcentage de germination des spores est élevé.

Aux deux mutants 60 et 61, nous avons conféré le symbole ds_2 (= désordre deuxième type).

(3) Mutant n° 62 : forme des asques ovoïdes dans lesquels les ascospores sont disposées en désordre (Pl. 25, fig. 7, 8). Leur longueur est légèrement inférieure à celle des spores de la souche sauvage (tabl. 1).

Symbole : ds_3 (= désordre troisième type).

(4) Mutant n° 63 : a ses ascospores disposées en désordre. Leur taille est identique à celle du témoin. Symbole : ds_4 (= désordre quatrième type).

c) MUTATIONS AFFECTANT LA TAILLE ET LA FORME DES ASCOSPORES

Alors que le type sauvage de *S. macrospora* a des ascospores noires ovoïdes de dimensions $21,2 \times 18 \mu$, nous avons obtenu plusieurs mutants dont les spores sont plus petites, plus grosses, ou de forme différente. Chez ces mutants, la disposition linéaire des ascospores dans l'asque n'est pas affectée.

(1) Mutant n° 64 (Symbole : spp_1) : les ascospores de cette souche sont plus petites et arrondies (Pl. 25, fig. 2). Leur diamètre moyen est de $16,8 \mu$ (tableaux 1 et 2).

(2) Mutant n° 65 (Symbole : spp_2) : les ascospores sont arrondies. Leur diamètre moyen est de $18,8 \mu$ (tableaux 1 et 2).

(3) Mutant n° 66 (Symbole : spa_1) : les ascospores de ce mutant sont nettement plus allongées et rappellent par leur forme celles du *Sordaria fimicola*. Toutefois, elles sont nettement plus grosses (Pl. 26, fig. 2). Leur longueur moyenne est de $23,9 \mu$ (tableaux 1 et 2) et leur largeur est inchangée.

Ainsi donc, pour un caractère aussi important en systématique que la taille des ascospores, une simple mutation suffit, en partant d'un type dont

la longueur moyenne des spores est de $21,2 \mu$ pour l'abaisser à $16,8 \mu$ ou pour l'augmenter à $23,9 \mu$. En outre, la forme même des ascospores peut être profondément modifiée.

d) MUTATIONS AFFECTANT LE NOMBRE ET LA TAILLE DES ASCOSPORES

Dans ce groupe, un peu arbitraire, nous plaçons quatorze mutants, obtenus indépendamment, que nous allons maintenant décrire :

(1) Mutant n° 67 (Symbole : gi_1). Dans cette souche, les ascospores ne sont plus délimitées. Au stade à huit noyaux, c'est la membrane elle-même de l'asque qui s'épaissit et se charge de pigment noir, constituant ainsi une très grosse spore en forme de massue (Pl. 26, fig. 1). De semblables mutants ont été obtenus antérieurement par DODGE chez *Neurospora* (34, 38, 41, 45, 46, 47). Nous y reviendrons ultérieurement.

(2) Mutant n° 68 (Symbole : ir_1). Ici le nombre des ascospores par asque varie de une à huit. Dans un même bouquet, on trouve tous les types d'asques et la sélection pour un type particulier se révèle inopérante. Ainsi, par exemple, le repiquage des spores les plus grosses ne conduit jamais, même s'il est répété sur plusieurs générations, à une augmentation de la taille moyenne des spores (et corrélativement à une diminution de leur nombre) (Pl. 26, fig. 5, 6, 7, 8).

La manifestation du caractère est très variable selon la température à laquelle la culture est faite (voir tableau 3). Ainsi, à 20°C , le nombre moyen d'ascospores par asque est de 3,9 et à 30° ce nombre est de 7. Par conséquent, plus la température augmente, plus la souche ir_1 tend à se rapprocher de la souche sauvage, en délimitant un nombre d'ascospores voisin de huit par asque.

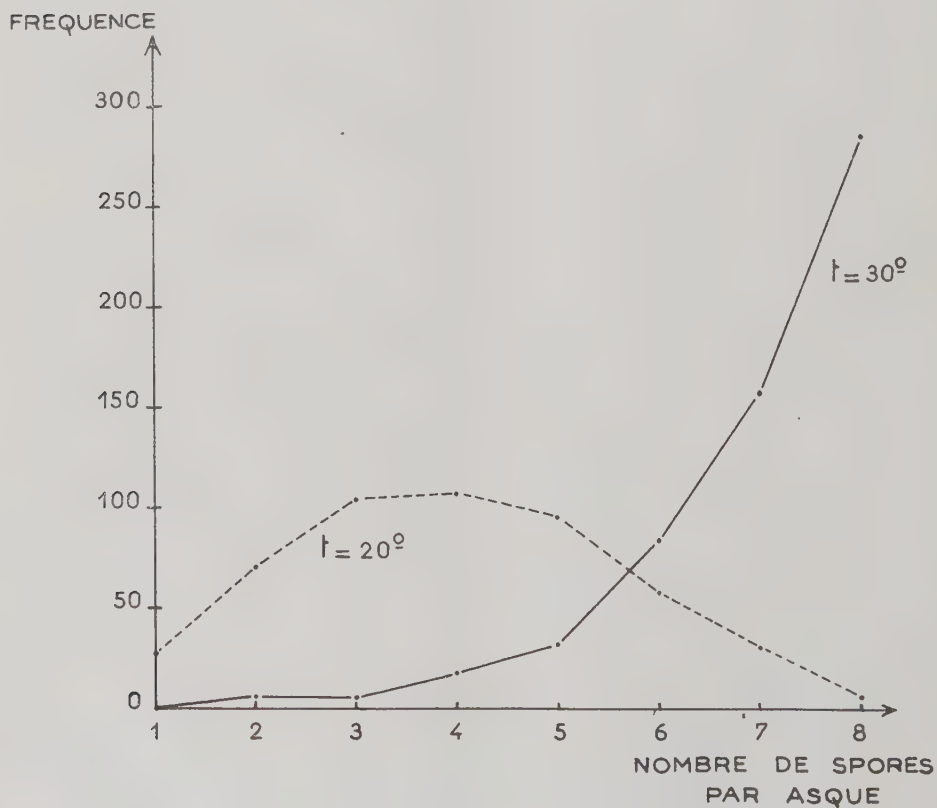
Nous avons rapporté précédemment les résultats que nous avons obtenus dans l'étude de la méiose chez la souche ir_1 . Les trois divisions se déroulent normalement dans l'asque et les anomalies ne se rencontrent qu'au moment de la délimitation des ascospores. Une inégalité de répartition des centrosomes, variable suivant les asques, peut alors entraîner la formation de spores géantes plurinucléées. Plus tard, chaque noyau subit une division supplémentaire, de telle sorte que l'asque contient alors, au total, seize noyaux dont la répartition dans les spores est très variable.

(3) Mutant n° 69 (Symbole : ir_2). Ce mutant est en tous points semblable au précédent.

(4) Mutant n° 70 (Symbole : ir_3). Cette souche présente les mêmes anomalies que les deux précédentes. Cependant, quelques différences permettent de l'identifier.

TABLEAU 3 - NOMBRE D'ASCOSPORES PAR ASQUE CHEZ LE MUTANT in_1 EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

NOMBRE DE SPORES TEMPERATURE	1	2	3	4	5	6	7	8
$t = 20^{\circ}$	28	70	103	106	95	57	30	6
$t = 30^{\circ}$	0	5	5	17	32	84	157	288



(5) Mutant n° 71 (Symbole : ir_4). Ce mutant a un comportement identique aux trois précédents. Toutefois, à température égale, le nombre d'ascospores délimitées est plus élevé.

(6) Mutant n° 72 (Symbole : sps_1). Il a déjà fait l'objet d'une étude cytologique détaillée. Nous savons que ses asques renferment en général plus de huit spores (jusqu'à seize), mais beaucoup d'entre elles avortent et restent hyalines, au lieu de se colorer en noir comme les spores normales viables. Ces spores hyalines sont totalement incapables de germer, que ce soit sur le milieu de Dodge ou sur fumier de cheval frais stérilisé (Pl. 27, 28).

Le nombre total d'ascospores (viables et avortées) par asque est donné par le tableau 4. On peut constater que le nombre minimum est de dix, le nombre maximum de vingt-deux.

L'étude cytologique de ce mutant nous a révélé que les huit centrosomes présents en télophase III subissaient chacun une division supplémentaire.

L'asque renferme alors huit noyaux et seize centrosomes. Ceci explique la formation d'un nombre maximum de seize ascospores, dont huit anucléées. Or, on observe fréquemment des nombres inférieurs à seize. Ceci peut s'expliquer de deux façons : ou bien plusieurs centrosomes coopèrent pour délimiter une seule ascospore, ou bien certains centrosomes dégénèrent sans délimiter de spore.

En ce qui concerne les asques contenant plus de seize spores, nous devons supposer que certains au moins des huit noyaux de télophase III ont subi une division supplémentaire et les centrosomes correspondant aussi.

(7) Mutant n° 73 (Symbole : sps_2). Identique à sps_1 .

(8) Mutant n° 74 (Symbole : sps_3). Identique à sps_1 et à sps_2 .

(9) Mutant n° 75 (Symbole : sps_4). Identique aux trois précédents.

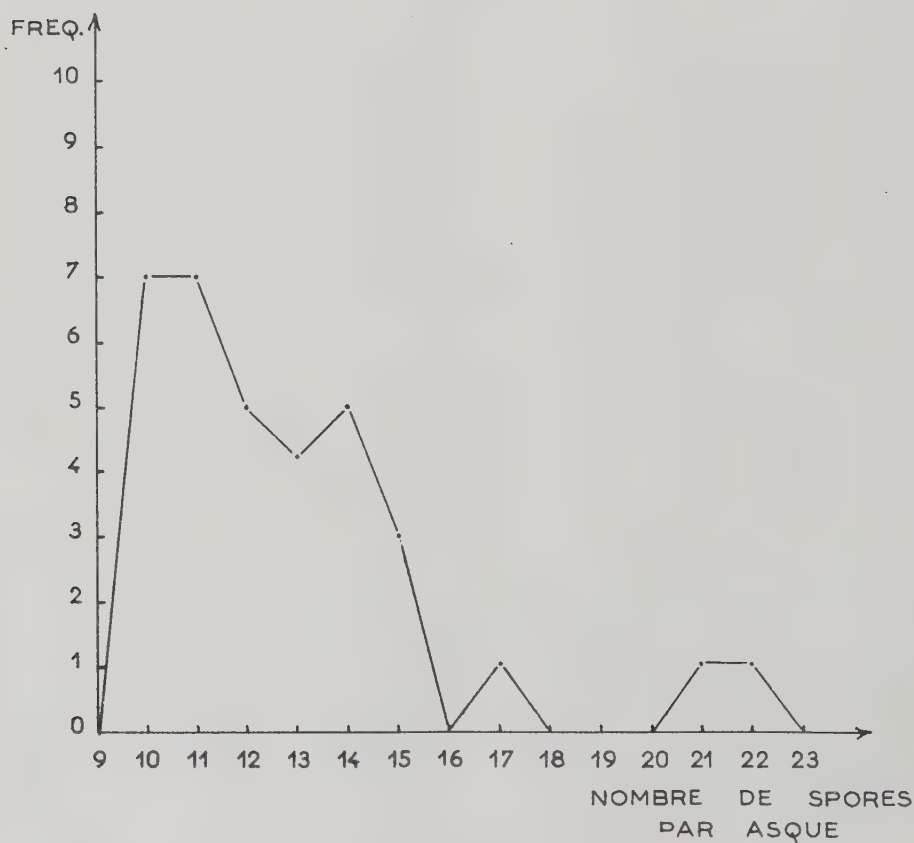
(10) Mutant n° 76 (Symbole : as_1). Ce mutant a fait l'objet d'une étude cytologique. Ses asques renferment à la fois des spores hyalines avortées et des spores viables. Ces dernières sont noires à maturité et nettement plus grosses que les ascospores normales. Le nombre des spores viables dans un asque varie entre zéro et quatre (Pl. 29, 30).

Nous savons que ce mutant est asynaptique, les chromosomes restant à l'état d'univalents en prophase I. Ultérieurement, ils se clivent ; mais les anaphases sont souvent aberrantes en raison d'anomalies dans le comportement des centrosomes.

(11) Mutants n° 77 et 78 (Symbole : an_1). Ces deux mutants sont indistinguables. Chaque périthèce comporte toujours une proportion très impor-

TABLEAU 4 - NOMBRE TOTAL D'ASCOSPORES
PAR ASQUE CHEZ LE MUTANT sps_1

NOMBRE DE SPORES	10	11	12	13	14	15	17	21	22
FREQUENCE	9	9	5	4	5	3	1	1	1



tante d'asques ayant délimité leurs huit ascospores, puis avorté ultérieurement. Dans ce cas, les ascospores (qui restent hyalines) sont incapables de germer.

En outre, on rencontre dans chaque bouquet des asques renfermant huit ascospores, les unes noires et viables, les autres petites, hyalines et incapables de germer. Le nombre de spores viables par asque varie de une à huit.

Il est à noter que cette irrégularité est une propriété permanente des deux souches 77 et 78 : toute culture monospore redonne naissance à une souche identique à celle de départ et présente les mêmes anomalies. La taille des ascospores viables est égale à celle des spores du type sauvage.

L'étude cytologique n'a pas été faite.

(12) Mutant n° 79 (Symbole : an_2). Il ressemble beaucoup aux deux précédents, en ce sens que chaque périthèce renferme toujours de nombreux asques dont les huit spores demeurent hyalines. Mais on y trouve aussi des asques contenant quelques ascospores noires viables. Le nombre de ces dernières n'excède jamais quatre par asque.

Par opposition, nous avons vu que chez les souches 77 et 78 certains asques contenaient huit spores noires viables.

e) MUTATIONS AFFECTANT LA CROISSANCE ET LA MORPHOLOGIE DU MYCÉLIUM

Les mutants de ce groupe sont très faciles à obtenir en employant la méthode (b) précédemment décrite. Dès la germination des ascospores, il est souvent aisé d'identifier ces mutants, soit par la croissance plus lente du mycélium, soit par la morphologie différente de ce dernier.

Nous aurions pu isoler ces mutants par dizaines. Nous avons évité de le faire, en réservant notre attention à ceux des quatre catégories que nous venons de décrire.

Au surplus, nous verrons plus tard que des mutants de ce groupe ont été obtenus en grand nombre sous l'action d'un corps chimique mutagène : l'acridine. Ces derniers mutants ont fait l'objet d'une étude génétique détaillée.

Finalement, nous n'avons retenu, parmi les mutants de cette catégorie, induits par les rayons X, que les deux souches n°s 80 et 81. Ces deux souches sont distinguables l'une de l'autre. Dans les deux cas, le mycélium a une croissance très lente. Les symboles attribués sont respectivement cl-1 et cl-2.

3. — ANALYSE GENETIQUE DES MUTANTS

Les quatre-vingt-une souches mutantes que nous venons de décrire ont été soumises à une analyse destinée à élucider la nature des différences génétiques qui les séparent du type sauvage.

A. — LES MÉTHODES

En l'absence d'un critère universellement valable, qui permette de distinguer la mutation génique vraie du remaniement chromosomique de faible étendue (petite délétion, petite inversion, etc...), nous avons opéré comme suit :

(1) Dans une première étape, chacun des quatre-vingt-un mutants a été croisé avec la souche sauvage. Un tel croisement consiste en fait à placer en contact les hyphes des deux souches, dans une boîte de Pétri contenant du milieu de Dodge ou du crottin de cheval frais stérilisé.

L'expérience nous a montré quelle était la méthode la meilleure pour obtenir le maximum d'asques hybrides. En effet, considérons, à titre d'exemple, la souche sauvage à spores noires et l'une des souches à spores blanches du groupe *bl*₁, soit le mutant n° 1. Pour obtenir des asques hybrides, on peut songer à ensemercer les deux souches en deux points opposés de la boîte de Pétri. Dans ces conditions, les deux colonies mycéliennes poussent l'une vers l'autre et se rencontrent suivant une ligne située dans la partie médiane de la boîte.

Quelques jours après, en raison du caractère homothallique de *S. macrospora*, les deux cultures se sont couvertes de périthèces, blancs d'un côté, noirs de l'autre. Un prélèvement effectué sur chacune des cultures nous apprend que les périthèces blancs ne renferment que des ascospores blanches et les périthèces noirs uniquement des spores noires.

Toutefois, si l'on examine les périthèces qui se sont formés sur la ligne de contact entre les deux souches, ou à proximité immédiate, on constate que certains d'entre eux contiennent des asques dont chacun renferme quatre spores noires et quatre spores blanches. Il s'agit, bien entendu, d'asques hybrides. Mais au total, pour l'ensemble de la boîte, la proportion en reste très faible.

Pour nous assurer le maximum d'asques hybrides, nous avons été amené à réaliser les confrontations entre souches selon un autre procédé. On prélève dans la souche sauvage et dans la culture n° 1 (*bl*₁) des carrés de gélose, de taille équivalente, contenant des hyphes.

Ces deux carrés sont placés dans une boîte de Pétri stérile, écrasés à l'aide d'un instrument convenable, puis les fragments en sont soigneusement mélangés. Le mélange est alors transféré au centre d'une boîte de

Pétri contenant du milieu de culture. Les anastomoses entre les hyphes des deux souches (+) et bl₁ ont pour conséquence la formation d'une proportion très importante d'asques hybrides, mais, bien entendu, le caractère homothallique de *Sordaria macrospora* se traduit par la présence de périthèces contenant les uns des asques à huit spores blanches et les autres des asques à huit spores noires.

Cependant, de toute façon, le but que nous nous étions fixé est atteint : nous sommes assuré, par cette méthode, que la culture renfermera un pourcentage élevé d'asques hybrides.

C'est par ce procédé que toutes les confrontations entre la souche sauvage et les quatre-vingt-un mutants ont été réalisées.

Le résultat recherché est clair : il s'agit de savoir si la ségrégation des caractères mutants s'effectue régulièrement dans tous les asques hybrides. En effet, si le mutant n° 1 (bl₁) par exemple ne diffère du type sauvage que par un seul gène, il ne fait pas de doute que les asques hybrides doivent toujours contenir quatre ascospores noires et quatre ascospores blanches. Ceci est une conséquence directe du déroulement de la méiose chez *S. macrospora* tel que nous l'avons établi par nos études cytologiques.

Par opposition, toute culture mutante porteuse d'un remaniement chromosomique de quelque étendue (inversion, translocation, etc.) ne conduira pas à une ségrégation régulière dans les asques hybrides issus du croisement avec la souche sauvage. Invariablement, certains de ces asques hybrides renfermeront des ascospores avortées. Ces avortements sont, en général, la conséquence de pertes plus ou moins étendues de segments chromosomiques (délétions).

Ce fait deviendra plus clair lorsque nous étudierons en détail les remaniements chromosomiques.

A dessein, nous avons pris comme exemple le croisement entre la souche sauvage et un mutant du groupe bl₁ en raison de la simplicité du phénomène. Le caractère bl₁ étant autonome, les asques hybrides sont immédiatement identifiables puisqu'ils renferment moitié de spores blanches et moitié de spores noires.

Il n'en est pas toujours de même. Ainsi, confrontons la souche sauvage, dont les spores sont en file linéaire, avec le mutant n° 60 (ds₂) dont les spores sont plus petites et disposées sur deux rangs. Nous ne trouvons, en apparence, que deux sortes d'asques, les uns identiques à ceux de la souche sauvage, les autres absolument semblables à ceux de la souche ds₂. Cependant, il est hautement probable que certains asques sont hybrides, mais nous ignorons lesquels *a priori*. Il nous faudra donc user d'un artifice (nous y reviendrons bientôt) pour identifier les asques hybrides avec certitude dans ce cas.

Le travail ne sera pas achevé pour autant. Nous devons encore nous assurer que la ségrégation du caractère est régulière. Il faudra donc extraire

les huit ascospores de chaque asque hybride, les repiquer isolément et, lorsque les cultures auront fructifié, vérifier que quatre d'entre elles sont identiques à la souche sauvage et les quatre autres identiques au mutant ds_2 . Il va de soi que cette opération devra être répétée sur un nombre assez grand d'asques hybrides.

L'application de la méthode (1) permet donc de s'assurer si un mutant peut être ou non considéré comme génique. Le procédé a d'évidentes limitations : une petite délétion, une petite duplication, une petite inversion risquent de passer pour autant de mutations géniques, mais cette critique — qui est parfaitement valable — n'est pas particulière à notre matériel. Les généticiens cherchent encore la méthode idéale qui permette d'identifier avec certitude les mutations géniques, en les séparant nettement des remaniements chromosomiques de faible étendue.

(2) Dans une deuxième étape, les quatre-vingt-un mutants ont été systématiquement confrontés deux à deux, toujours par la même technique. Pour réduire ce travail au maximum, nous avons d'abord croisé ensemble les mutants d'aspect identique, classés dans le même groupe. Par exemple, nous avons réalisé les vingt et une confrontations possibles entre les sept mutants du premier groupe, etc...

La mise en œuvre de cette deuxième série de croisements constitue, à proprement parler, un *test d'allélisme* dont il convient de discuter les conséquences.

Considérons, par exemple, deux mutants quelconques du premier groupe (spores blanches). Nous savons que ces deux mutants sont identiques morphologiquement. Cependant, étant donné qu'ils résultent de mutations distinctes, nous ignorons si le même gène a muté dans les deux cas. Le procédé le plus simple pour établir si les mutants en question sont allèles consiste à les croiser. En supposant qu'ils le soient, les asques issus du croisement ne devront renfermer que des ascospores blanches. Si, au contraire, il s'agit de deux gènes non allèles, une fraction au moins des asques hybrides renfermeront des ascospores noires identiques à celles du type sauvage (ces ascospores auront reçu les deux allèles sauvages correspondants).

Par ce procédé, il est donc très facile d'étudier un groupe de mutants et de déterminer le nombre et la nature des gènes ayant muté.

Toutefois, une critique peut être formulée. En effet, si, par exemple, nous mélangeons dans une boîte de Pétri du mycélium des souches n^{os} 1 et 2 (à spores blanches), nous n'observons dans la descendance que des asques contenant huit spores blanches. On ne peut évidemment reconnaître les trois types d'asques possibles, à savoir : les asques purs de la souche n^o 1 ; les asques purs de la souche n^o 2, les asques hybrides (1×2). Nous n'avons donc aucune preuve que le croisement a effectivement eu lieu. Or, le test d'allélisme n'est valable que s'il n'apparaît pas de spores

noires dans les asques hybrides. L'objection est, à vrai dire, beaucoup moins solide qu'on ne pourrait le croire *a priori*. En effet, dans le croisement entre deux souches quelconques, des asques hybrides s'obtiennent toujours avec la plus grande facilité, à condition que le mélange des mycélias ait été correctement effectué.

Au surplus, nous verrons bientôt comment la difficulté peut être tournée, et de quelle façon les asques hybrides peuvent être à coup sûr identifiés.

B. — LES RÉSULTATS

a) Mutations affectant la couleur des ascospores.

Groupe (1). — Pour les sept mutants à spores blanches du groupe 1, la confrontation avec la souche sauvage a révélé que, pour tous, sauf le n° 5, la ségrégation s'effectue régulièrement dans les asques hybrides. Il en résulte que ces six mutants (n°s 1, 2, 3, 4, 6, 7) sont des mutants géniques.

Par contre, la souche n° 5, dans les mêmes conditions, donne des asques hybrides renfermant des spores avortées. Elle est donc porteuse d'un remaniement chromosomique dont la nature n'a pas été précisée.

Par ailleurs, le croisement des sept souches deux à deux n'a conduit en aucun cas à l'apparition d'ascospores noires. Par conséquent, les sept souches sont porteuses du même gène mutant, pour lequel nous conserverons le symbole bl_1 .

Groupe (2). — La souche n° 8 donne une ségrégation régulière dans le croisement avec la race sauvage. En outre, sa confrontation avec les sept mutants du groupe 1 ne conduit pas, à première vue, à la formation de spores noires. Il semble donc qu'il s'agisse d'un mutant génique, allèle bl_1 . Nous le désignerons par bv .

Groupe (3). — Pour la souche n° 9, les conclusions sont identiques. Il semble qu'on ait affaire à un autre allèle de bl_1 , que nous désignerons par be_1 .

Notons tout de suite que la situation n'est pas aussi simple pour bv et be_1 que nous l'indiquons ici. Nous remettons à plus tard une discussion détaillée.

Groupe (4). — Les neuf souches du groupe 4 donnent une ségrégation régulière (quatre noires, quatre jaunes) dans les asques hybrides issus de la confrontation avec la souche sauvage. En outre, leurs confrontations deux à deux ne donnent pas d'ascospores noires. En conséquence, elles sont toutes porteuses du même gène mutant que nous désignerons par j_1 .

Groupe (5). — On observe des faits identiques pour les huit souches à

spores jaune foncé du groupe 5. Il en résulte que ces souches portent le même gène, désigné par j_2 . Nous verrons plus tard que j_1 et j_2 sont deux gènes distincts.

Groupe (6). — Le groupe 6 comporte trois souches à spores jaune-doré. Dans les confrontations avec la souche sauvage, ces trois mutants donnent des asques hybrides renfermant toujours des spores avortées. Par conséquent, les trois souches portent chacune un remaniement chromosomique.

Enfin, ces trois souches sont différentes, car leur confrontation deux à deux donne des ascospores noires et on rencontre aussi des spores avortées.

Groupe (7). — Les neuf mutants à spores roses du groupe 7 donnent une ségrégation régulière (quatre spores noires, quatre spores roses) dans les croisements avec la souche sauvage. Leur croisement deux à deux ne produit pas d'ascospores noires. Il en résulte que les neuf souches portent le même gène mutant désigné par r_1 .

Groupe (8). — Le mutant n° 39, à ascospores rose violacé, montre en croisement avec les neuf souches r_1 une ségrégation régulière (quatre spores roses, quatre spores rose violacé) dans les asques hybrides. Ce mutant porte donc un allèle du gène r_1 . Nous désignerons cet allèle par rv .

Groupe (9). — Des deux mutants à spores rose pâle, n°s 40 et 41, l'un (le n° 40) donne une ségrégation régulière (quatre spores noires, quatre spores roses) en croisement avec la race sauvage. Quant à l'autre (n° 41), il conduit invariablement à des asques hybrides contenant des spores avortées. Il est donc porteur d'un remaniement chromosomique.

La confrontation entre les souches n°s 40 et 41 ne donne pas d'ascospores noires.

La souche n° 40 porte un gène mutant que nous désignerons par r_2 .

Groupe (10). — Les quatre mutants à ascospores vert-olive, n°s 42 à 43, ont un comportement régulier en croisement avec le type sauvage. En outre, leur croisement deux à deux indique qu'il s'agit d'allèles. Au gène correspondant nous avons donné le symbole vo_1 .

Groupe (11). — Il en est de même pour les dix mutants à spores violettes de ce groupe. Leur allèle commun a été désigné par vi_1 . En outre, en confrontant les mutants du groupe 11 avec ceux du groupe 10, on constate que vo_1 et vi_1 sont deux allèles.

Groupe (12). — Le mutant n° 56, à ascospores beige verdâtre, est un mutant génique, puisqu'il donne une ségrégation régulière en croisement avec la souche sauvage. Au gène qu'il porte, nous avons donné le sym-

bole v_1 . Nous verrons plus tard qu'il s'agit d'un gène particulier, différent de vi_1 et vo_1 .

Groupe (13). — Nous avons déjà signalé le caractère très spécial de la souche 57, à spores vert-olive. Nous savons qu'elle est instable et qu'elle renferme toujours des asques hybrides à spores noires. La ségrégation étant parfaitement régulière dans ces asques, nous considérons que la souche 57 porte un gène mutant, soit vo_2 . Ce gène est très instable. Nous verrons plus tard qu'il n'est l'allèle d'aucun autre gène déjà décrit.

Groupe (14). — Enfin, la souche n° 58, à spores beige foncé, a un comportement très particulier. En effet, si on la confronte avec le type sauvage, on ne trouve dans la culture que deux types d'asques : les uns contiennent huit spores noires, les autres huit spores beige foncé. Nous verrons plus tard comment nous sommes parvenu à montrer qu'il s'agit ici d'un caractère *non autonome*, les asques hybrides possédant huit spores noires. Par la dissection de ces asques et le repiquage des huit ascospores nous avons montré que la ségrégation était régulière, puisqu'on obtient toujours, à partir de chaque asque hybride, quatre cultures à spores noires et quatre cultures à spores beige foncé.

En conséquence, la souche 58 est porteuse d'un gène mutant que nous désignerons par *bf*.

Il nous est maintenant possible de réunir et de commenter nos résultats en ce qui concerne les gènes commandant la couleur des ascospores chez *S. macrospora*. Les neuf loci suivants ont été identifiés :

allèles	{	bl_1 :	ascospores de couleur blanche	
		bv :	asc.	» » blanc verdâtre
		be_1 :	asc.	» » beige
		j_1 :	asc.	» » jaune clair
		j_2 :	asc.	» » jaune foncé
allèles	{	r_1 :	asc.	» » rose foncé
		rv :	asc.	» » rose violacé
		r_2 :	asc.	» » rose pâle
allèles	{	vo_1 :	asc.	» » vert olive
		vi_1 :	asc.	» » violette
		v_1 :	asc.	» » beige verdâtre
		vo_2 :	asc.	» » vert olive
		bf :	asc.	» » beige foncé

Compte non tenu du mutant *bf*, sur lequel nous reviendrons, une souche de chacun des huit autres groupes a ensuite été choisie et nous avons réalisé entre elles les vingt-huit croisements possibles.

Dans tous les cas, nous avons obtenu des asques hybrides contenant

des ascospores noires. Il en résulte que nous avons affaire à huit loci distincts, que nous symboliserons désormais de la façon suivante :

$$bl_1; j_1; j_2; r_1; r_2; vo_1; v_1; vo_2.$$

Les tests d'allélisme entre groupes auxquels nous venons de faire allusion nous ont permis du même coup, par une analyse statistique des divers types d'asques hybrides observés, d'établir si les huit loci sont indépendants ou non (situés ou non sur des chromosomes distincts). Nous reportons à plus tard l'exposé de ces résultats.

b) *Mutations affectant la disposition des ascospores dans l'asque*

Pour ces mutants, dont les ascospores sont disposées en désordre ou sur deux rangs, le test de régularité de ségrégation est, à première vue, plus difficile à faire. En effet, si nous réalisons les cinq confrontations possibles de ces mutants avec la souche sauvage, nous constatons que, dans chaque cas, on ne peut distinguer que deux sortes d'asques dans la culture :

- des asques dont les huit ascospores sont disposés linéairement ;
- des asques identiques au mutant étudié (spores sur deux rangs ou en désordre).

Il est donc impossible de savoir quels sont les asques hybrides, et, par conséquent, on ne peut appliquer le test.

Or, nous savons qu'un mutant quelconque du groupe bl_1 ne diffère de la race sauvage que par un seul gène, aucune modification structurale ne les séparant par ailleurs.

Le caractère de bl_1 de couleur de spore étant autonome, nous pouvons l'utiliser en croisant nos cinq mutants à spores en désordre avec une souche bl_1 . Dans ces conditions, les asques hybrides seront immédiatement identifiables, puisqu'ils renferment à la fois des ascospores noires et des ascospores blanches.

Il va de soi que nous aurions pu utiliser avec un égal succès l'un quelconque des sept autres gènes affectant la couleur des ascospores, puisque leur manifestation est autonome. Par contre, cela n'aurait pas été possible avec le mutant bf qui est non autonome, comme nous l'avons déjà signalé.

Ayant réalisé les cinq confrontations possibles entre bl_1 d'une part et les mutants 59 à 63 de l'autre, nous avons constaté que, dans tous les cas, les asques hybrides renferment quatre spores noires et quatre spores blanches. Il n'y a pas de spores avortées. Ainsi, les cinq mutants ne sont porteurs d'aucun remaniement chromosomique. En outre, si nous repiquons isolément les huit ascospores issues d'un asque hybride quelconque, nous obtenons

nous huit cultures dont quatre forment des asques à disposition linéaire et quatre des asques où les spores sont en désordre (ou sur deux rangs). Il est donc clair que les cinq souches en question ne diffèrent chacune de la race sauvage que par un seul gène.

Les cinq confrontations que nous venons de mentionner nous indiquent, en plus, que les asques hybrides ont leurs huit spores disposées linéairement, comme chez la race sauvage. En outre, dans le croisement $bl_1 \times$ (60 ou 61), les asques hybrides contiennent des ascospores dont la taille et la forme sont identiques à celles de la souche sauvage, alors que les souches 60 et 61 ont des spores nettement plus petites et rondes. Nous discuterons plus loin de la question de savoir si l'on peut parler, à ce propos, d'un phénomène de dominance.

A partir des cinq croisements qui viennent d'être mentionnés, des repiquages de spores issues d'asques hybrides ont permis d'obtenir des mutants doubles, du type $bl_1 ds_1$ (spores blanches en désordre). Nous avons de même isolé les doubles mutants $bl_1 ds_2$ (avec 60 et 61) ; $bl_1 ds_3$; $bl_2 ds_4$. Des tests d'allélisme entre les cinq souches ont été ensuite effectués. Dans une première étape, les cinq mutants initiaux ont été croisés deux à deux. On a constaté que, sur les dix croisements possibles, neuf donnaient des résultats identiques, à savoir : dans chaque culture hybride, on rencontre, en plus des asques des deux types parentaux, des asques dont les spores sont linéairement disposées. Ces asques sont vraisemblablement des asques hybrides. Etant conformes à ceux du type sauvage, ils indiquent que les deux gènes confrontés ne sont pas allèles.

Le dixième croisement (60×61) n'a, par contre, donné aucun asque de type sauvage. Il en résulte que les souches 60 et 61 possèdent le même allèle que nous désignerons par ds_2 .

La nature hybride des asques qui apparaissent dans ces croisements et dont les huit spores sont linéairement disposées est facile à prouver : le repiquage de leurs huit ascospores conduit à quatre types de cultures :

- cultures identiques à l'un des mutants ;
- cultures identiques à l'autre mutant ;
- culture de type sauvage ;
- culture du double mutant, où le désordre des ascospores est en général accentué.

Au surplus, nous disposons d'un moyen simple de confirmation. Il suffit, en effet, de réaliser les dix croisements précédents en s'arrangeant pour que les deux souches confrontées diffèrent toujours par la couleur des ascospores. Par exemple ($bl_1 ds_1 \times ds_2$). Dans ce cas, la culture hybride renferme trois types d'asques bien distincts, à savoir :

- des asques à spores blanches en désordre ($bl_1 ds_1$) ;
- des asques à spores noires plus petites sur deux rangs (ds_2) ;

— des asques contenant quatre spores noires et quatre spores blanches, linéairement disposées (hybrides).

Quant au croisement 60×61 , nous pouvons le réaliser sous la forme $bl_1 60 \times 61$. La descendance comporte trois types d'asques, à savoir :

- des asques à spores blanches sur deux rangs ($bl_1 60$) ;
- des asques à spores noires sur deux rangs (61) ;
- des asques contenant quatre spores noires et quatre spores blanches sur deux rangs (hybrides).

On est certain ainsi que l'hybridation a réellement eu lieu. La conclusion précédemment formulée, selon laquelle les deux souches 60 et 61 portent le même allèle, se trouve donc pleinement justifiée.

Au total, quatre gènes distincts ont été identifiés, que nous désignerons par les symboles ds_1 , ds_2 , ds_3 , ds_4 .

c) Mutations affectant la taille et la forme des ascospores

Nous savons que ce groupe comporte trois mutants : spp_1 , spp_2 et spa_1 . Les deux premiers ont des ascospores petites et le troisième des ascospores plus allongées que le type sauvage.

Par croisement de ces trois mutants avec la souche sauvage (ou mieux avec bl_1), on établit que les asques hybrides contiennent toujours des spores identiques au type sauvage, en ce qui concerne à la fois la taille et la forme ; en outre, les repiquages monospores à partir des asques hybrides révèlent que la ségrégation est régulière. Les trois mutants précédents sont par conséquent des mutants géniques.

Les trois confrontations de ces mutants deux à deux (réalisées avec l'aide du marqueur bl_1) donnent, dans chaque cas, des asques hybrides de type sauvage. Il en résulte que nous avons affaire à trois gènes distincts, qui sont désignés par les symboles spp_1 , spp_2 , spa_1 .

d) Mutations affectant le nombre et la taille des ascospores

Nous rappelons que ce groupe comporte treize mutants que l'on peut ranger en quatre catégories sur la base des ressemblances morphologiques, soit :

- 1° gi_1 : formation d'une spore unique en massue ;
- 2° ir_1 , ir_2 , ir_3 , ir_4 : variation dans le nombre d'ascospores par asque (entre une et huit) ;
- 3° sps_1 , sps_2 , sps_3 , sps_4 : asques renfermant plus de huit ascospores, certaines avortées ;
- 4° as_1 , an_1 (77 et 78), an_2 : asques contenant huit ascospores, certaines avortées.

Dans une première étape, chacun des treize mutants a été croisé avec bl_1 . Dans tous les cas, on a rencontré trois types distincts d'asques, à savoir :

- des asques (à ascospores noires) conformes à ceux du mutant étudié ;
- des asques à spores blanches, identiques à bl_1 ;
- des asques hybrides, contenant moitié de spores noires et moitié de spores blanches, disposées linéairement et dont *le nombre, la taille et la forme sont strictement identiques* à ceux du type sauvage (ou à ceux de bl_1).

Des spores avortées n'ont été rencontrées qu'une seule fois dans les asques hybrides, en fait dans ceux issus du croisement $ir_3 \times bl_1$. Il en résulte que le mutant ir_3 est porteur d'un remaniement chromosomique.

Pour les douze croisements, nous avons disséqué des asques hybrides sous le contrôle de la loupe binoculaire et repiqué les huit ascospores qu'ils renferment. Dans ces conditions, nous avons constaté que la ségrégation est régulière et qu'on obtient toujours, à partir d'un asque hybride (issu par exemple du croisement $bl_1 \times sps-1$) :

- quatre cultures identiques au mutant (asque ayant plus de huit spores) ;

— quatre cultures identiques à la race sauvage (asque à huit spores).

Bien entendu, on peut ainsi obtenir tous les mutants doubles possibles, à savoir, dans le cas que nous avons choisi, le mutant $bl_1 sps_1$.

Ces résultats nous autorisent donc à conclure qu'à part ir_3 , les deux autres souches ne diffèrent de la race sauvage que par un seul gène.

Dans une deuxième étape, nous avons confronté les douze mutants deux à deux, en un test d'allélisme. Opérant d'abord, pour simplifier, à l'intérieur des quatre groupes, nous avons fait les trois croisements possibles entre ir_1 , ir_2 et ir_4 . Bien entendu, nous avons à nouveau utilisé, pour distinguer les asques hybrides, le caractère bl_1 (ou tout autre équivalent). Nos confrontations ont donc été du type :

$$ir_1 \times ir_2 bl_1$$

Ici, nous avons constaté que les asques hybrides montraient la même irrégularité dans le nombre des ascospores par asque que les deux souches parentes. Il en résulte que ir_1 et ir_2 sont allèles. Il est facile d'établir qu'il en est de même pour ir_4 . Au total, un seul locus est en cause, que nous désignerons désormais par ir_1 .

Pour le groupe $sps_1, sps_2, sps_3, sps_4$, il y a six croisements possibles. Cinq d'entre eux conduisent à des résultats identiques, en ce sens que la confrontation donne deux types d'asques :

- asques possédant plus de huit spores ;
- asques ayant huit spores viables (identique au type sauvage).

Si l'on repique les ascospores extraites de ce deuxième type d'asque, on

observe une ségrégation et on obtient en particulier des cultures identiques à la souche sauvage. Ces asques sont donc des asques hybrides et, du même coup, nous établissons le fait que les deux mutants confrontés possèdent des gènes distincts, non allèles.

Sur les six croisements, seul $sps_3 \times sps_4$ ne conduit à aucun asque hybride de type sauvage. La conclusion est que ces deux mutants sont allèles ($sps_3 = sps_4$).

Au total, il y a donc trois gènes distincts que nous désignerons désormais par les symboles sps_1 , sps_2 , sps_3 .

Sans qu'il soit nécessaire d'entrer dans le détail, nous pouvons dire que les trois gènes as_1 , an_1 et an_2 sont également distincts. Les trois croisements possibles donnent dans tous les cas des asques indistinguables de ceux du type sauvage.

Enfin, il en est de même des vingt-huit croisements entre gi_1 , ir_1 , sps_1 , sps_2 , sps_3 , as_1 , an_1 , an_2 . Il est donc légitime de conclure que ces huit gènes sont bien distincts.

e) *Mutations affectant la croissance et la morphologie du mycélium*

Nous n'avons isolé que deux mutants appartenant à cette catégorie : cl - 1 et cl - 2. Ils sont tous deux caractérisés par une croissance très lente.

Pour déterminer s'il s'agissait de mutations géniques, nous les avons croisés avec la souche bl_1 . Les asques hybrides ont été disséqués et les huit ascospores de chaque série repiquées. On a constaté que quatre d'entre elles donnaient du mycélium dont la vitesse de croissance était normale et les quatre autres un mycélium à croissance lente, identique au mutant considéré. Cette régularité indique que cl - 1 et cl - 2 sont des mutants géniques.

Le test d'allélisme a été réalisé en confrontant cl - 1 et cl - 2. Nous rencontrons ici un phénomène très intéressant : dans les vingt-quatre ou quarante-huit heures qui suivent la mise en contact des hyphes des deux souches, un mycélium à croissance rapide, identique au mycélium de la souche sauvage, se dégage du mélange et envahit rapidement toute la boîte de Pétri. Un grand nombre de périthèces se forment en périphérie.

L'analyse de la descendance est rendue possible si l'on réalise la confrontation entre cl - 1 et bl_1 cl - 2 par exemple. On constate alors que la culture renferme des asques hybrides ségrégeant pour la couleur des ascospores (quatre noires, quatre blanches).

Si l'on repique des ascospores issues d'asques hybrides, on obtient invariablement trois types de cultures : à croissance lente, à croissance très lente (mutant double cl - 1 cl - 2), à croissance rapide. Ces dernières sont identiques à la souche sauvage. Nous pouvons donc conclure que cl - 1 et cl - 2 sont des mutants distincts.

La formation du mycélium à croissance rapide, issu du mélange de $cl-1$ et $cl-2$ peut, à elle seule, être considérée comme une preuve de ce que les deux gènes sont distincts (non allèles).

En effet, un tel phénomène est bien connu. Il a été observé antérieurement par BEADLE et COONRADT (8) chez *Neurospora crassa*. Il s'agissait ici de la confrontation de mutants biochimiques distincts sur le milieu de culture minimum. Sur ce milieu, la souche sauvage pousse normalement. Au contraire, les mutants biochimiques, pris séparément, ne peuvent s'y développer. Si toutefois on ensemente deux mutants biochimiques différents sur le milieu minimum, un mycélium de type sauvage ne tarde pas à se former et envahit toute la culture.

BEADLE et COONRADT interprètent ce phénomène en supposant qu'il se forme, à la suite d'anastomoses entre hyphes, un mycélium hétérocaryotique dont les articles plurinucléés renferment les deux types de noyaux. Si l'on admet que les deux mutants biochimiques diffèrent chacun de la souche sauvage par un seul gène récessif, on conçoit que des phénomènes de dominance puissent jouer, à condition que les deux gènes en cause ne soient pas allèles.

C'est pourquoi la formation, à partir de deux mutants biochimiques, d'un mycélium hétérocaryotique, capable de croître sur le milieu synthétique minimum, constitue une excellente preuve de ce que les gènes mutants correspondants ne sont pas allèles.

En ce qui concerne *S. macrospora*, l'étude cytologique des hyphes nous a indiqué qu'ils étaient toujours plurinucléés. Au surplus, il nous a été donné souvent d'observer des fusions ou anastomoses entre hyphes. Il n'est donc pas douteux que, dans des conditions favorables, des hyphes hétérocaryotiques puissent prendre naissance.

La confrontation des deux souches $cl-1$ et $cl-2$ nous en apporte la preuve. Le mycélium à croissance rapide (et de type sauvage) qui naît de leur contact renferme à coup sûr les deux types de noyaux $cl-1$ et $cl-2$. Il en résulte que $cl-1$ et $cl-2$ sont des gènes distincts non allèles. Il en résulte aussi que ce sont des gènes récessifs.

On peut d'ailleurs prouver que le mycélium à croissance rapide est vraiment hétérocaryotique. Il suffit de préparer les deux souches ($bl_1 cl-1$) et ($r_1 cl-2$). On croise ces deux souches et on prélève des extrémités d'hyphes sur le mycélium à croissance rapide. Chacune des cultures est alors confrontée avec la souche sauvage. La descendance comporte, en particulier, des asques hybrides contenant quatre spores noires et quatre spores blanches, et d'autres renfermant quatre spores noires et quatre spores roses. C'est une preuve indiscutable que les articles des hyphes à croissance rapide possédaient bien les deux types de noyaux ($bl_1 cl-1$) et ($r_1 cl-2$).

Toutefois, ce test particulier d'allélisme doit être utilisé avec précau-

tion. Si les conclusions précédentes apparaissent parfaitement valables, puisqu'un mycélium hétérocaryotique a effectivement pris naissance, il n'en est pas de même dans la négative. Si de la confrontation de deux mutants à croissance lente ne naît aucun mycélium à croissance rapide, il est hasardeux de conclure que les deux gènes en cause sont allèles. En effet, divers auteurs, en particulier GARNJOBST (63) et HOLLOWAY (84), ont récemment montré que la formation et la stabilité d'un mycélium hétérocaryotique, chez *Neurospora*, peuvent être sous la dépendance de gènes absolument distincts de ceux qui sont responsables d'une croissance lente ou d'une déficience biochimique.

4. — REMARQUES SUR LE COMPORTEMENT DES CARACTERES

Il est utile de résumer l'ensemble des observations précédentes en ce qui concerne le comportement des caractères dans les croisements.

Les gènes gouvernant la couleur de l'ascospore occupent une place à part. En effet, tous, sauf le gène *bf*, commandent un processus biochimique autonome. Puisque dans le croisement avec la race sauvage les asques hybrides renferment toujours quatre spores noires et quatre spores « colorées », nous devons conclure que ces dernières se développent, dans l'asque, d'une façon tout à fait indépendante.

On peut admettre que la mutation de l'un quelconque des gènes *bl*₁, *j*₁, *j*₂, *r*₁, *r*₂, etc..., se traduit par la rupture, en un point, de la chaîne des réactions qui conduit à la synthèse du pigment noir, présent dans la race sauvage. Cette hypothèse est en accord avec l'interprétation généralement donnée dans l'étude des mutants biochimiques chez *Neurospora*.

Dans ces conditions, puisqu'il n'y a pas interaction, dans les asques hybrides, entre les quatre spores noires et les quatre spores « colorées », et que ces dernières ont ici la même couleur que dans la souche mutante pure, c'est qu'aucun transfert de substances intermédiaires ne se produit entre les spores sauvages et les spores mutantes. On peut par conséquent supposer que la synthèse des pigments a lieu à l'intérieur même de l'ascospore.

Le comportement des autres gènes mérite, lui aussi, d'être examiné à nouveau. Ces gènes gouvernent soit la disposition des ascospores dans l'asque (*ds*₁, *ds*₂, *ds*₃, *ds*₄), soit enfin le nombre et la taille de ces dernières (*gi*₁, *ir*₁, *sps*₁, *sps*₂, *sps*₃, *as*₁, *an*₁, *an*₂, *spp*₁, *spp*₂, *spa*₁).

Tous ces caractères ont en commun une remarquable absence d'autonomie. En effet, lorsque ces mutants sont croisés avec le type sauvage, les asques hybrides obtenus sont absolument identiques à ceux de la race sauvage. Par voie de conséquence, la confrontation de ces mutants deux à deux conduit aussi à des asques hybrides de type sauvage.

Comment ce phénomène peut-il s'interpréter ? A notre avis, il résulte

simplement de ce que le caractère d'un asque apparaît commandé par la constitution génétique des deux noyaux de la cellule ascogène. Il suffit alors d'admettre que les seize mutants ci-dessus sont récessifs, ce qui ne semble pas représenter un obstacle majeur (à ce propos, nous verrons plus tard de quelle façon il a été possible de démontrer que les gènes gouvernant la couleur de l'ascospore sont récessifs. Nous savons par ailleurs que *cl-1* et *cl-2* sont également récessifs).

Bien entendu, cette conclusion n'est valable que pour les quinze loci mentionnés ci-dessus ; nous nous garderons de la généraliser.

5. — DIFFERENCES DANS LES FREQUENCES D'ISOLEMENT DES MUTANTS GENIQUES

En résumé, le nombre des loci distincts identifiés s'établit comme suit :

- huit loci commandant la couleur des ascospores ;
- quatre loci commandant la disposition des ascospores dans l'asque ;
- trois loci commandant la taille ou la forme des ascospores ;
- huit loci gouvernant le nombre et la taille des ascospores.

Soit au total vingt-trois loci distincts, auxquels il y a peut-être lieu d'ajouter le locus *bf*. Toutefois, pour ce dernier, les tests d'allélisme n'ont pas été complets et nous ignorons s'il s'agit d'un gène distinct des précédents.

Le nombre des mutants indépendamment isolés pour chaque locus est le suivant, en ce qui concerne les gènes modifiant la couleur de l'ascospore :

Locus	<i>bl</i> ₁	<i>j</i> ₁	<i>j</i> ₂	<i>r</i> ₁	<i>r</i> ₂	<i>vo</i> ₁	<i>v</i> ₁	<i>vo</i> ₂	<i>bf</i>
Nombre de mutants isolés	9	9	8	10	2	14	1	1	1

et parmi les autres, nous savons que :

- *ir*₁ a muté quatre fois,
- *sps*₃ » deux fois,
- *an*₁ » deux fois.

Enfin, les gènes restants n'ont muté qu'une seule fois.

Quelle valeur doit-on attribuer à ces chiffres ? Donnent-ils une idée des fréquences relatives de mutation des différents gènes ? Il est manifeste que non si l'on considère tous les gènes sans discrimination.

En effet, il est bon de rappeler que les gènes régissant la couleur de l'ascospore (sauf *bf*) sont autonomes dans leur manifestation, et ceci facilite l'isolement des mutants correspondants, car — dans une culture irradiée — la mutation est identifiable non seulement sous la forme d'un bouquet d'asques homogène (rose par exemple), mais aussi sous la forme hété-

rozygote (bouquet dont les asques sont en disjonction, chacun renfermant quatre spores noires et quatre spores roses).

De fait, par application de la méthode d'isolement (a), décrite ci-dessus, nous avons obtenu un grand nombre de ces mutants, souvent à l'état d'asques en disjonction, la purification étant faite ultérieurement.

Par contre, les autres gènes, ceux qui régissent la disposition, la forme, la taille et le nombre des ascospores, sont — nous l'avons vu — non autonomes. L'asque hybride est indistinguishable d'un asque de type sauvage. En conséquence, de tels mutants ne sont identifiables par la méthode (a) que dans la mesure où ils donnent des asques purs mutants. Il en résulte que, dans une culture irradiée, un bon nombre de ces mutants passent inaperçus.

Au total, nous voyons que les mutants autonomes de la première catégorie ont beaucoup plus de chances d'être isolés — par la méthode (a) — que les mutants non autonomes du deuxième groupe.

Bien entendu, cette inégalité disparaît si l'on isole les mutants par la méthode (b) qui consiste, rappelons-le, à repiquer isolément des ascospores issues de cultures irradiées.

Ici donc, il semble légitime de ne comparer entre elles que les fréquences d'isolement des mutants autonomes — tous obtenus par la méthode (a). On constate que les loci r_2 , v_1 et vo_2 semblent moins mutables que les autres. Toutefois, gardons présent à l'esprit le fait qu'il s'agit d'une fréquence d'isolement et non d'une fréquence de mutation.

Une inégalité, même légère, dans le pouvoir germinatif des ascospores, suffirait à expliquer les différences observées. Cependant, nous n'avons pas trouvé que les ascospores des souches r_2 , v_1 et vo_2 germaient moins bien que celles des autres souches, et, pour cette raison, nous sommes enclins à considérer que les loci r_2 , v_1 et vo_2 sont vraiment moins mutables que bl_1 , j_1 , j_2 , r_1 et vo_1 .

6. — MUTATIONS ANALOGUES CHEZ D'AUTRES ESPECES

Il importe enfin de rechercher si des mutants comparables à ceux que nous venons de décrire ont été obtenus par d'autres auteurs, soit chez *Sordaria* ou *Pleurage*, soit chez *Neurospora*, soit chez d'autres espèces de Sphérialés.

Considérons d'abord les mutations affectant la couleur des ascospores. Deux mutations de cette sorte, désignées sous les noms lactea et rubiginosa, ont été décrites et étudiées par ZICKLER (174, 175) chez *Bombardia lunata*. Sans que l'auteur donne de précisions sur ce point, il semble qu'il s'agisse de deux gènes allèles. Le comportement de ces caractères est autonome.

Chez *Sordaria fimicola*, OLIVE (117) a obtenu récemment trois mutants

ayant respectivement des spores grises, jaunes et blanches. Ces mutants ont aussi un comportement autonome.

Chez ce même Ascomycète, M^{me} CHAVASSE-FRÉTAZ (non publié) a réussi à isoler, après traitement aux rayons X, sept groupes de mutants dont les ascospores sont gris-blanc (bl), roses (r), verdâtre (v), dorées (or), vert moutarde (m) blanches (i), ou blondes (bd). Tous ces caractères, sauf le dernier, sont autonomes. Nous avons donc ici une situation tout à fait comparable à celle rencontrée chez *S. macrospora*.

STADLER (158, 159) a isolé récemment un mutant à spores incolores chez *N. crassa*. Ce caractère est commandé par un gène situé dans le groupe de liaison n° 6. En réalité, il ne s'agit pas à proprement parler d'une mutation affectant la couleur de l'ascospore, mais bien d'une mutation létale. En effet, ces spores incolores ne mûrissent pas en général et sont incapables de germer. C'est donc là une situation très différente de celle observée dans les cas précédents.

En ce qui concerne les autres caractères que nous avons observés chez *S. macrospora*, nous pensons être le premier à avoir isolé des mutants du type ds (spores en désordre), ir (nombre variable de spores), sps (spores supplémentaires), as (asynaptique), an (anormaux).

Cependant, chez *S. fimicola*, M^{me} CHAVASSE-FRÉTAZ (non publié) a trouvé un mutant génique dont les asques renferment quatre ascospores. L'étude cytologique et génétique a établi que les spores se délimitent au moment où l'asque renferme quatre noyaux. Le même auteur a aussi obtenu un mutant dont les asques ne contiennent qu'une seule spore elliptique. Cette souche est porteuse d'un remaniement chromosomique.

Quant à notre mutant gi_1 (spore unique en massue), il a son homologue chez *N. tetrasperma*. En effet, DODGE (34, 38, 45, 47) a décrit un gène (I) qui — dans les asques Ii ou II — entraîne précisément la même anomalie. Toutefois, il s'agit ici d'un gène dominant, alors que gi_1 est récessif. DODGE a formulé l'hypothèse que I pourrait être, en fait, une petite déficience.

DODGE (35) a également signalé, chez *N. tetrasperma*, un gène récessif d. Les asques dd atteignent une taille normale, mais tous avortent sans qu'il se soit formé d'ascospores.

Enfin, DODGE (41, 46) a étudié, chez *N. tetrasperma*, l'action du gène *E* considéré au départ comme un létal dominant. En fait, sur un milieu spécial, la souche pure *E* peut être maintenue, mais elle ne fructifie pas. Par croisement de cette souche avec une culture normale *e*, on obtient des asques hybrides *Ee*. Sur un milieu de culture adapté, ces asques forment huit ascospores, alors que les asques *ee* de la race sauvage n'en renferment que quatre.

7. — REMANIEMENTS CHROMOSOMIQUES

Nous avons déjà signalé que la recherche de mutants par la méthode (a) révèle que beaucoup des périthèces examinées renferment des asques contenant des ascospores avortées.

Ainsi qu'on le verra plus loin, ces dernières résultent des cassures et remaniements chromosomiques qui ont été induits par le rayonnement X.

Ces accidents sont, au total, très complexes. Si nous considérons un noyau particulier, soumis à l'action des rayons X, il peut être le siège d'une série d'événements dont nous ne citerons que les principaux :

(1) Un ou plusieurs chromosomes peuvent être cassés et les fragments acentriques se trouver perdus à la mitose suivante, par incapacité de gagner les pôles.

(2) Si plusieurs cassures coexistent dans le noyau, les extrémités brisées peuvent se recombinaison dans un ordre différent de l'ordre initial. La tendance qu'ont les points de rupture à se ressouder entre eux est un fait bien connu qui semble avoir une valeur générale.

Ces remaniements sont de diverses catégories. Si les deux cassures affectent un même chromosome, un segment intercalaire peut aussi se ressouder dans un ordre différent : c'est l'inversion.

Si deux cassures affectent deux chromosomes distincts, il peut y avoir soit un échange simple, soit une translocation réciproque.

Aux doses les plus élevées, le noyau renfermera un grand nombre de cassures et les remaniements chromosomiques résultants pourront être extrêmement compliqués.

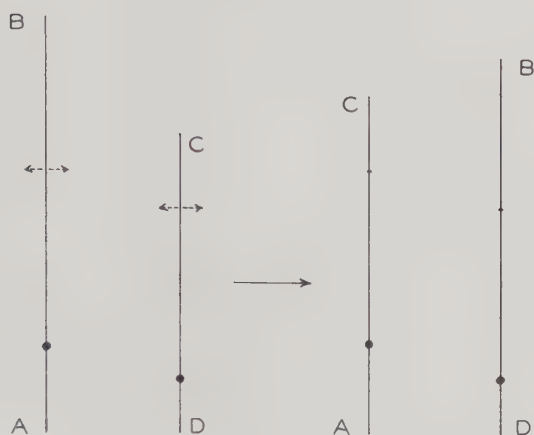
Parmi les modifications structurales qui peuvent résulter de l'irradiation, deux présentent un intérêt particulier, en ce sens qu'elles n'entraînent aucune perte de substance chromosomique. Ce sont la translocation réciproque et l'inversion (cette dernière pouvant contenir ou non le centromère). Il convient donc de leur consacrer une étude détaillée.

a) LA TRANSLOCATION RÉCIPROQUE. CAS GÉNÉRAL

Les irradiations ont toujours été effectuées sur des hyphes et nous savons que ceux-ci ne contiennent que des noyaux haploïdes.

Considérons un tel noyau haploïde et supposons que deux de ses chromosomes AB et CD soient brisés. S'il y a échange des fragments sans centromères, nous aboutissons aux deux nouveaux chromosomes AC et BD (tableau 5). Si, dans ces conditions, il se trouve qu'ultérieurement le noyau affecté se multiplie, il se pourra qu'un jeune asque reçoive deux noyaux identiques (AC, BD). Au moment de l'appariement des chromosomes dans le noyau de fusion, il y a constitution des deux bivalents AC/AC et BD/BD. La méiose se déroulera d'une façon absolument régulière, et puisque aucun

TABLEAU 5 - TRANSLOCATION RECIPROQUE - CAS GENERAL -



NOMENCLATURE

● (AB,CD) et (AC,DB): spore noire viable

AVORTEES	⊗ (AB,AC):	déficienc	pour D ,	duplication	pour A
	⊙ (BD,CD):	déficienc	pour A ,	duplication	pour D
	⊕ (AB,BD):	déficienc	pour C ,	duplication	pour B
	○ (AC,CD):	déficienc	pour B ,	duplication	pour C
SPORES	⊗ (AB,AB):	déficienc	pour C et D ,	duplication	pour A et B
	⊗ (AC,AC):	déficienc	pour B et D ,	duplication	pour A et C
	⊕ (BD,BD):	déficienc	pour A et C ,	duplication	pour B et D
	⊕ (CD,CD):	déficienc	pour A et B ,	duplication	pour C et D

segment chromosomique n'est manquant, les huit ascospores résultantes seront viables. La nouvelle souche haploïde, qu'on peut alors isoler par repiquage de ces ascospores, a donc une parfaite stabilité.

Mais il arrivera aussi qu'un jeune asque reçoive deux noyaux haploïdes, dont l'un sera conforme au type initial (AB, CD) et l'autre porteur de la translocation réciproque, soit (AC, BD). La fusion des deux noyaux aura lieu et sera suivie par l'appariement des chromosomes. Selon une règle dont la généralité est bien établie, nous savons que l'association se réalise toujours entre régions homologues. Ici, par conséquent, il est clair qu'il se formera non plus deux bivalents, mais bien un groupe de quatre chromosomes (tableaux 6 et 7).

Comment ce tétravalent va-t-il se comporter à la méiose ? Il est utile de numérotter les quatre centromères : I, II, III, IV. Cela étant, nous savons que, dès le pachytène, chacun des quatre chromosomes se clive et, simultanément, des échanges (crossing-over) peuvent avoir lieu entre chromatides non homologues.

Ici, la présence ou l'absence de crossing-over dans les deux segments *a* et *b* aura un rôle déterminant. Nous devons donc considérer séparément chacune des éventualités, à savoir :

- Pas de crossing-over ni en *a*, ni en *b* ;
- Crossing-over en *a* ; pas de crossing-over en *b* ;
- Pas de crossing-over en *a* ; crossing-over en *b* ;
- Crossing-over en *a* et en *b* ;

Pour simplifier, nous nous limitons aux crossing-over simples.

1°) *Pas de crossing-over en a et b* (tableau 6).

Le tétravalent peut alors se disjoindre de trois façons distinctes que nous pouvons schématiser en indiquant ceux des centromères qui passent au même pôle en anaphase I :

- (I-II) $\longleftrightarrow$ (III-IV) : ségrégation adjacente.
 (I-III) $\longleftrightarrow$ (II-IV) : ségrégation adjacente.
 (I-IV) $\longleftrightarrow$ (II-III) : ségrégation en « festons ».

Rien ne prouve, *a priori*, que ces trois éventualités sont également probables. Il semble même à peu près certain qu'elles ne le sont pas. En effet, on observe les trois modes chez le maïs, mais avec des fréquences généralement différentes. En outre, chez les *Oenothera* (hétérozygotes pour des complexes), on ne rencontre que la ségrégation en « festons ».

Quoi qu'il en soit, ces trois types de ségrégation conduisent aux constitutions suivantes en télophase I :

- (AB, AC) $\longleftrightarrow$ (BD, CD)
 (AB, BD) $\longleftrightarrow$ (AC, CD)
 (AB, CD) $\longleftrightarrow$ (AC, BD)

En réalité, nous avons volontairement simplifié le symbolisme, mais il importe d'avoir présent à l'esprit le fait que chaque chromosome est déjà clivé en deux chromatides. En anaphase II, les deux chromatides de chaque chromosome se séparent et partent à des pôles opposés. Un nouveau clivage a lieu en anaphase III.

Nous avons vu que, chez *S. macrospora*, les fuseaux de deuxième et ceux de troisième division n'empiètent pas. Il en résulte que les huit noyaux restent alignés dans l'ordre à l'intérieur de l'asque.

Au total, par conséquent, chacun des trois types de ségrégation conduit à des asques renfermant respectivement :

- (— 4 spores (AB, AC) : duplication de A, déficience de D ;
- (— 4 spores (BD, CD) : duplication de D, déficience de A ;
- (— 4 spores (AB, BD) : duplication de B, déficience de C ;
- (— 4 spores (AC, CD) : duplication de C, déficience de B ;
- (— 4 spores (AB, CD) : conformes à celles du type sauvage ;
- (— 4 spores (AC, BD) : porteuses de la translocation réciproque ;

Les quatre spores d'un type sont groupées et occupent soit la moitié supérieure, soit la moitié inférieure de l'asque.

Pour peu que les déficiences affectent des segments chromosomiques suffisamment longs, les ascospores des quatre premiers types avorteront. On peut s'attendre à ce que cet avortement ait lieu à un stade du développement de l'ascospore variable suivant la nature de la déficience. C'est pourquoi il nous a paru utile de choisir, dans chaque cas, une figuration particulière (tableau 5). On notera que nos schémas ne tiennent pas compte de ce que l'asque a une base et un sommet.

2°) *Crossing-over en a ; pas de crossing-over en b* (tableau 6).

Dans cette éventualité, on peut supposer que les trois modes précédents de ségrégation sont encore possibles. Nous verrons ultérieurement ce qu'il faut penser de cette hypothèse.

On obtient alors, respectivement, les trois constitutions suivantes en télophase I :

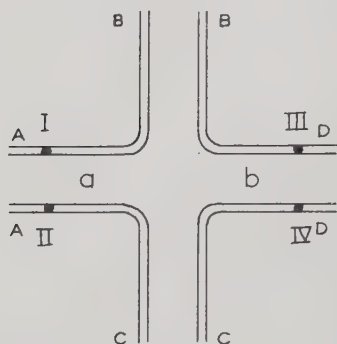
- (1) — (AB, AC ; AB, AC) $\longleftrightarrow$ (BD, BD ; CD, CD)
- (2) — (AB, AC ; BD, BD) $\longleftrightarrow$ (AB, AC ; CD, CD)
- (3) — (AB, AC ; CD, CD) $\longleftrightarrow$ (AB, AC ; BD, BD)

Nous avons explicité les chromatides attachées à chaque centromère, étant donné que ces chromatides ne sont pas toujours identiques.

En anaphase II, ces couples de chromatides vont se séparer et leurs éléments vont partir à des pôles opposés. Il est vraisemblable que la ségré-

TABLEAU 6 _ TRANSLOCATION RECIPROQUE _ CAS GENERAL

1. PAS DE CROSSING-OVER
NI EN a NI EN b :



SEGREGATION
(I - II) - (III - IV)



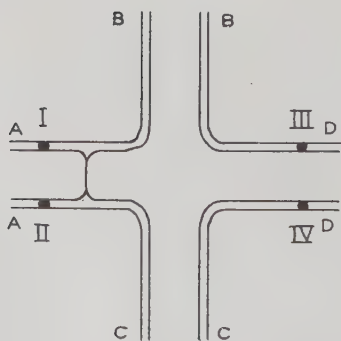
SEGREGATION
(I - III) - (II - IV)



SEGREGATION
(I - IV) - (II - III)



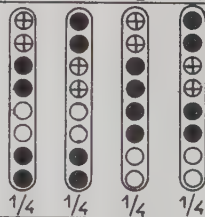
2. CROSSING-OVER EN a ,
PAS DE CROSSING-OVER
EN b :



SEGREGATION
(I - II) - (III - IV)



SEGREGATION
(I - III) - (II - IV)



SEGREGATION
(I - IV) - (II - III)

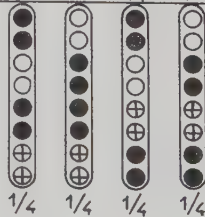


TABLEAU 7 TRANSLOCATION RECIPROQUE CAS GENERAL

3 PAS DE CROSSING-OVER

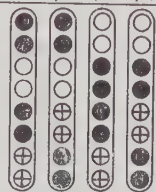
EN a, CROSSING-OVER EN b :

SEGREGATION
(I - II) . (III - IV)



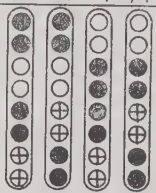
$\frac{1}{4}$ $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{4}$

SEGREGATION
(I - III) . (II - IV)



$\frac{1}{4}$ $\frac{1}{4}$ $\frac{1}{4}$

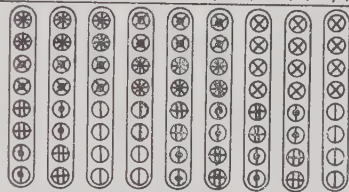
SEGREGATION
(I - IV) . (II - III)



$\frac{1}{4}$ $\frac{1}{4}$ $\frac{1}{4}$

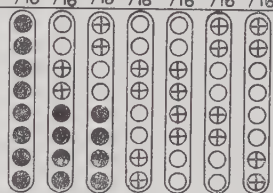
4 CROSSING-OVER EN
a ET b :

SEGREGATION
(I - II) . (III - IV)



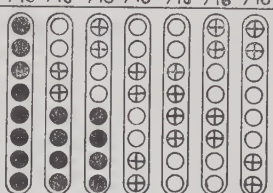
$\frac{1}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{1}{16}$

SEGREGATION
(I - III) . (II - IV)



$\frac{1}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{1}{16}$

SEGREGATION
(I - IV) . (II - III)



$\frac{1}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{2}{16}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{1}{16}$

gation d'un couple s'effectuera indépendamment de celles des autres couples, que ceux-ci soient ou non dans le même noyau.

Ainsi, à partir de l'asque (1) ci-dessus, nous aboutirons — avec une égale probabilité — à l'une des deux distributions suivantes en télophase II :

$$\begin{aligned}\alpha & - (AB, AB) \text{ --- } (AC, AC) \text{ --- } (BD, CD) \text{ --- } (BD, CD) \\ \beta & - (AB, AC) \text{ --- } (AB, AC) \text{ --- } (BD, CD) \text{ --- } (BD, CD)\end{aligned}$$

La troisième mitose, précédant la formation des ascospores, ne modifiera pas ces répartitions. Elle n'aura pour effet que d'assurer la présence de chaque type de noyau en double exemplaire. Les spores iront donc toujours par paires.

Ces schémas α et β ne tiennent pas compte d'ailleurs de toutes les positions relatives. Pour les obtenir, il suffit d'effectuer des permutations entre les spores faisant partie du même asque. Le tableau 6 donne les différents types d'asques et leur fréquence. En outre, il ne faut pas oublier que l'asque a une base et un sommet ; cela revient à doubler le nombre des types en retournant chacun d'eux bout pour bout.

A partir de l'asque (2) ci-dessus, on aboutit de même à la distribution suivante en télophase II :

$$(AB, BD) \text{ --- } (AC, BD) \text{ --- } (AB, CD) \text{ --- } (AC, CD)$$

En effectuant les permutations entre les noyaux faisant partie de chaque demi-asque, on obtient finalement les quatre sortes d'asques du schéma. Elles sont toutes également probables.

Il est facile de voir qu'à partir de l'asque (3) on obtient exactement les mêmes types d'asques qu'à partir de (2).

3°) Pas de crossing-over en a ; crossing-over en b (tableau 7).

Continuant à considérer que les trois modes de ségrégation sont encore possibles, nous obtenons, respectivement, les trois constitutions suivantes en télophase I :

$$\begin{aligned}(1) & (AB, AB ; AC, AC) \longleftrightarrow (BD, CD ; BD, CD) \\ (2) & (AB, AB ; BD, CD) \longleftrightarrow (AC, AC ; BD, CD) \\ (3) & (AB, AB ; BD, CD) \longleftrightarrow (AC, AC ; BD, CD)\end{aligned}$$

Il ne nous paraît pas utile de décrire en détail la façon dont on établit les différents types d'asques et leurs fréquences, à partir des trois constitutions précédentes. Le procédé est le même que celui qui a déjà été décrit.

Le tableau 7 donne l'ensemble des résultats.

4°) *Crossing-over en a et en b* (tableau 7).

Les trois modes de ségrégation nous conduisent, dans ce cas, aux trois constitutions suivantes en télophase I :

- (1) (AB, AC ; AB, AC) $\longleftrightarrow$ (BD, CD ; BD, CD)
 (2) (AB, AC ; BD, CD) $\longleftrightarrow$ (AB, AC ; BD, CD)
 (3) (AB, AC ; BD, CD) $\longleftrightarrow$ (AB, AC ; BD, CD)

Partant de là, on peut aisément calculer les différents types d'asques obtenus dans chaque cas et leurs fréquences. Les tableaux 6 et 7 donnent l'ensemble des résultats.

La règle de MC CLINTOCK.

Le calcul précédent a été fait en supposant que les trois modes de ségrégation sont possibles (sinon également probables).

En réalité, MC CLINTOCK (105) a montré, à l'occasion de ses études sur les translocations réciproques chez le maïs, que chaque fois qu'un crossing-over a eu lieu entre le centromère et le point de cassure, les centromères homologues passent à des pôles opposés.

Le même auteur a établi qu'il en est de même pour les translocations réciproques chez *Neurospora*. Cet Ascomycète étant très voisin des *Sordaria*, il est hautement probable que la règle s'applique également ici. Nous verrons ultérieurement que les faits expérimentaux confirment cette façon de voir.

Dans ces conditions, si les trois modes de ségrégation paraissent possibles quand il n'y a aucun crossing-over dans les régions *a* et *b*, par contre, l'un d'eux est impossible en présence de crossing-over.

Ainsi, qu'il y ait un crossing-over en *a*, ou en *b*, ou simultanément en *a* et *b*, seules les deux disjonctions suivantes sont réalisables :

- (I-III) $\longleftrightarrow$ (II-IV)
 (I-IV) $\longleftrightarrow$ (II-III)

Il en résulte que les asques correspondant à la disjonction (I-II) $\longleftrightarrow$ (III-IV) n'apparaissent pas. Il y a donc lieu, en supprimant ces asques, de modifier les conclusions auxquelles nous étions précédemment parvenu. Le tableau 8 donne les résultats définitifs du calcul.

On a supposé que les délétions étaient toujours suffisamment étendues pour entraîner l'avortement des ascospores qui en présentent. Seules les spores de constitution (AB, CD), conformes au type sauvage, et celles (AC, BD), porteuses de la translocation réciproque, sont viables.

Il est facile de constater que lorsqu'un asque renferme des ascospores

TABLEAU 8_TRANSLOCATION RECIPROQUE_

RESULTATS D'ENSEMBLE, COMPTE TENU DE LA REGLE
DE MC CLINTOCK_

1_PAS DE CROSSING-OVER NI EN a NI EN b



2_CROSSING-OVER EN a PAS DE CROSSING-OVER EN b :



$1/4$



$1/4$



$1/4$



$1/4$

3_PAS DE CROSSING-OVER EN a CROSSING-OVER EN b :



$1/4$



$1/4$



$1/4$



$1/4$

4_CROSSING-OVER EN a ET b :



$1/16$



$1/16$



$1/16$



$1/16$



$1/16$



$1/16$



$1/16$

viables, elles sont toujours de deux sortes et en nombres égaux : les unes sont de type sauvage, les autres portent la translocation réciproque.

Il en résulte que l'on peut maintenir, sous une forme hétérozygote, une translocation réciproque de ce type. Si l'on dispose d'un bouquet d'asques en disjonction, on sait qu'il comporte moitié de spores normales et moitié de spores à translocation. En le repiquant, on s'assure qu'à la génération suivante on réobtiendra des périthèces en disjonction, identiques à celui dont on est parti. Ce système peut donc être qualifié d'auto-entretenu.

Parmi les nombreux types possibles de remaniements chromosomiques, seule la translocation réciproque et les deux types d'inversions possèdent ce caractère.

b) LA TRANSLOCATION RÉCIPROQUE INÉGALE

Il peut assurément se produire que les segments chromosomiques faisant l'objet d'une translocation réciproque soient inégaux, l'un d'eux étant très petit (tabl. 9).

Dans ces conditions, on doit s'attendre à ce que la disjonction observée soit différente de celle que nous avons précédemment décrite.

En effet, dans ce cas, il se peut que les ascospores de constitution (AC, CD), n'étant déficientes que pour la région B, de faible étendue, soient sinon viables, du moins d'aspect apparemment normal (noires).

Des translocations de cette sorte ont été effectivement observées par Mc CLINTOCK (105) chez *Neurospora*.

Notre schéma général se modifie alors comme il est indiqué sur le tableau 9. Ici, on a figuré en noir les ascospores (AC, CD). Toutefois, leur aspect extérieur peut être absolument normal, si la région B est suffisamment petite, sans pour cela qu'elles soient capables de germer.

Le tableau 9 tient compte de la règle de Mc CLINTOCK.

c) L'INVERSION PÉRICENTRIQUE (tableau 10)

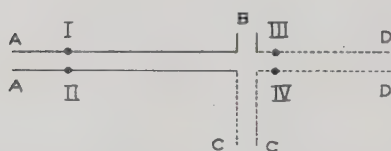
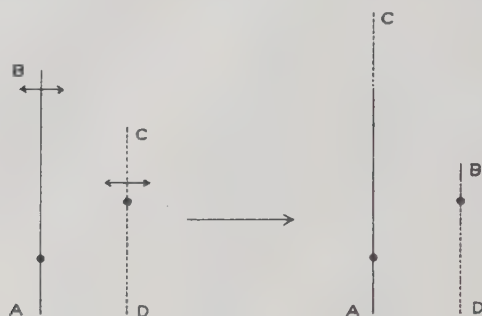
Dans ce cas, la zone d'inversion comporte le centromère. On peut représenter le chromosome normal par A B C D E F et le chromosome, porteur de l'inversion, par A E D C B F, les ruptures initiales ayant lieu entre A et B d'une part, E et F d'autre part.

Si la cellule ascogène a reçu deux noyaux possédant l'un et l'autre le chromosome inversé, le noyau de fusion sera le siège d'un appariement absolument normal et l'asque renfermera huit ascospores noires viables.

Par contre, si la cellule ascogène reçoit deux noyaux différents, l'un normal et l'autre porteur de l'inversion, l'appariement de ces chromosomes ne pourra s'effectuer qu'avec formation d'une boucle. C'est là un phénomène bien connu qui a été étudié chez de nombreux organismes.

TABLEAU 9 _TRANSLOCATION RECIPROQUE INEGALE_

RESULTATS D'ENSEMBLE COMPTE TENU DE LA REGLE DE MC CLINTOCK _



1_PAS DE CROSSING-OVER

NI EN a NI EN b :



SEGR.

SEGR.

SEGR.

(I - II)(III-IV)(I - III)(II-IV)(I - IV)(II - III)

2_CROSSING-OVER EN a ,

PAS DE CROSSING-OVER EN b .



$\frac{1}{2}$

$\frac{1}{2}$

SEGREGATION (I - III)(II - IV)

ET (I - IV)(II - III)

3_PAS DE CROSSING-OVER EN a ,

CROSSING-OVER EN b :



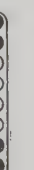
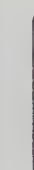
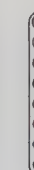
$\frac{1}{2}$

$\frac{1}{2}$

SEGREGATION (I - III)(II - IV)

ET (I - IV)(II - III)

4_CROSSING-OVER EN a ET EN b :



$\frac{4}{16}$

$\frac{4}{16}$

$\frac{4}{16}$

$\frac{1}{16}$

$\frac{1}{16}$

$\frac{1}{16}$

$\frac{1}{16}$

$\frac{1}{16}$

SEGREGATION (I - IV)(II - III)

ET (I - III)(II - IV)

Plus tard, les deux chromosomes vont se cliver et, simultanément, des échanges (crossing-over) pourront se produire entre chromatides.

Si l'inversion n'affecte qu'un segment relativement court, nous n'aurons que deux éventualités à considérer :

- 1° il n'y a pas de crossing-over dans la boucle d'inversion ;
- 2° il y a un crossing-over dans la boucle.

Mais si l'inversion est très longue, aux deux possibilités précédentes s'ajoutent les deux suivantes :

3° deux crossing-over dans l'inversion, de part et d'autre du centromère ;

- 4° deux crossing-over dans l'inversion, du même côté du centromère.

Le tableau 10 indique quels sont les types d'asques que l'on peut s'attendre à rencontrer dans chaque cas.

d) L'INVERSION PARACENTRIQUE (tableau 11)

Le centromère se trouve à l'extérieur de la région inversée. Dans nos schémas, nous avons supposé que le centromère était terminal.

Le chromosome normal est désigné par A B C D E F et le chromosome porteur de l'inversion par A E D C B F.

La nomenclature est donc la même que précédemment.

Dans le cas où la cellule ascogène a reçu un noyau de chaque sorte, le noyau de fusion sera hétérozygote pour l'inversion, et l'appariement des deux chromosomes ne pourra s'effectuer qu'avec formation d'une boucle.

En ce qui concerne les échanges entre les chromatides, on peut considérer les quatre éventualités suivantes :

- 1° Il n'y a pas de crossing-over dans la boucle d'inversion ;
- 2° il y a un crossing-over dans la boucle, mais aucun entre le centromère et la zone d'inversion ;
- 3° il y a deux crossing-over dans l'inversion ;
- 4° il y a un crossing-over dans l'inversion et un autre dans la région située entre le centromère et l'inversion.

Le tableau 11 montre quels sont les types d'asques correspondant à chacune des quatre possibilités que nous venons de mentionner.

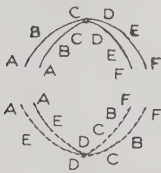
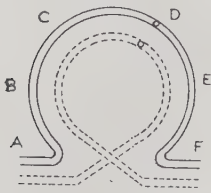
e) EXEMPLES DE REMANIEMENTS CHROMOSOMIQUES

Dans notre recherche de mutants géniques, nous avons rencontré des milliers de bouquets dont les asques, en disjonction, renfermaient des ascospores avortées. Sans nul doute, ceci traduisait la présence de remaniements chromosomiques.

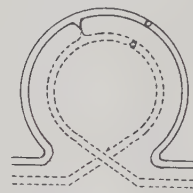
TABLEAU 10_ INVERSION

PERICENTRIQUE _

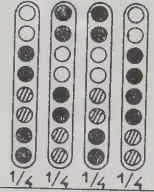
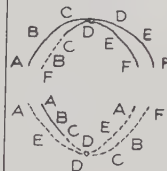
1_ PAS DE CROSSING-OVER DANS L'INVERSION :



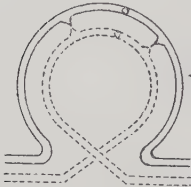
2_ UN CROSSING-OVER DANS L'INVERSION :



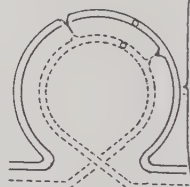
1-3
1-4
2-3
2-4



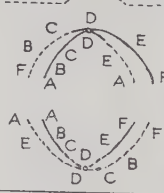
3_ DEUX CROSSING-OVER DANS L'INVERSION DE PART ET D'AUTRE DU CENTROMERE :



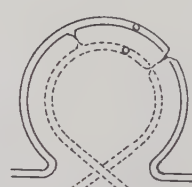
1-3, 1-3
2-3, 2-3
1-4, 1-4
2-4, 2-4



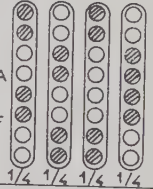
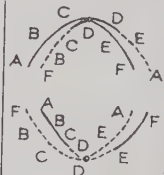
1-3, 1-4
1-3, 2-3
1-4, 2-4
2-3, 1-3
1-4, 1-3
2-3, 2-4
2-4, 1-4
2-4, 2-3



1/2 1/2



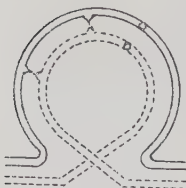
2-3, 1-4
1-3, 2-4
1-4, 2-3
2-4, 1-3



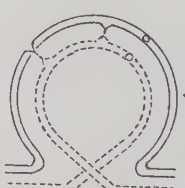
4_ DEUX CROSSING-OVER DU CENTROMERE :

DANS L'INVERSION

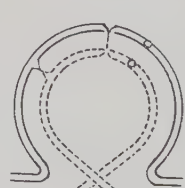
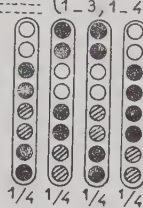
DU MEME COTE



1-4, 1-4
2-3, 2-3
2-4, 2-4
1-3, 1-3



1-3, 2-3
1-4, 1-3
2-3, 2-4
2-4, 1-4
1-4, 2-4
2-3, 1-3
2-4, 2-3
1-3, 1-4



1-3, 2-4
2-4, 1-3
1-4, 2-3
2-3, 1-4

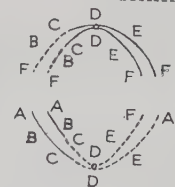
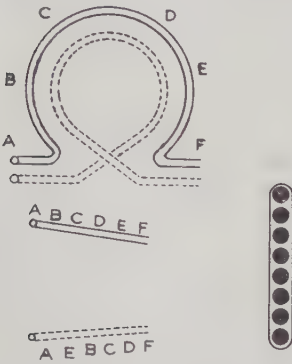


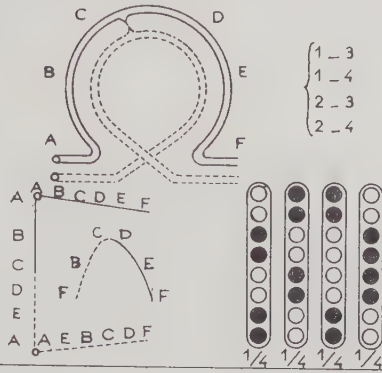
TABLEAU 11. INVERSION

PARACENTRIQUE -

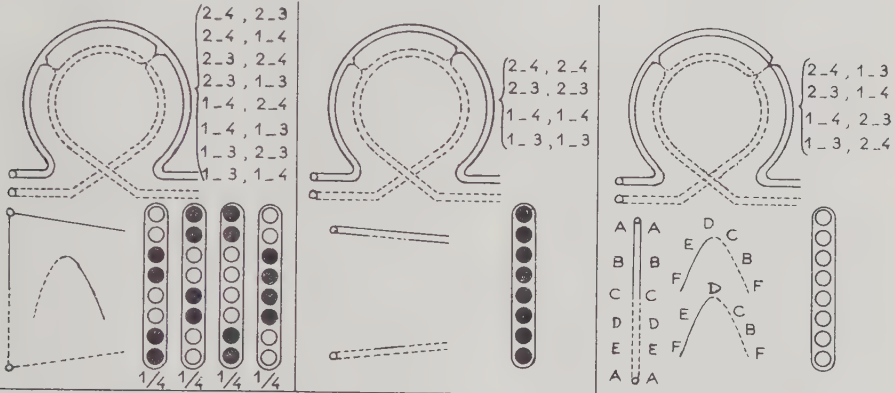
1. PAS DE CROSSING-OVER DANS L'INVERSION :



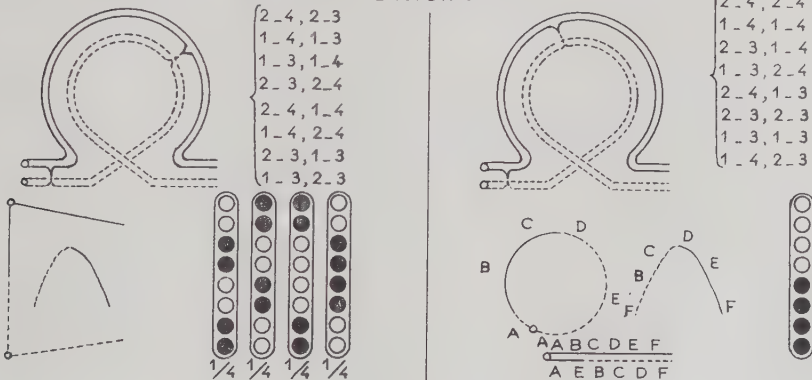
2. UN CROSSING-OVER DANS L'INVERSION :



3. DEUX CROSSING-OVER DANS L'INVERSION :



4. UN CROSSING-OVER DANS L'INVERSION ET UN CROSSING-OVER ENTRE CENTROMERE ET INVERSION :



Toutefois, l'isolement des mutants géniques nous ayant paru plus intéressant — tout au moins au départ — nous n'avons attaché que peu d'importance aux remaniements chromosomiques. Deux seulement ont été isolés et ont fait l'objet d'une étude. Il s'agit des souches T-1 et 201.

1°) *La souche T-1*

Elle fut isolée, au départ, sous forme d'un bouquet d'asques en disjonction, contenant des spores avortées. Ce bouquet fut repiqué en entier sur le milieu de Dodge. La culture fructifia et l'on constata que la moitié environ des périthèces contenaient des asques en disjonction identiques à ceux du départ. L'expérience put être répétée plusieurs fois. Il s'avérait donc qu'il s'agissait d'un système auto-entretenu et, par conséquent, soit d'une translocation réciproque, soit d'une inversion.

Le tabl. 12 et les Pl. 37 et 38 indiquent les onze types d'asques observés, compte non tenu de l'orientation par rapport au sommet et à la base de l'asque.

Les fréquences correspondent à la température de 21°C.

Il est facile d'isoler la souche pure, porteuse du remaniement chromosomique. Nous savons, en effet, que dans chaque asque contenant des spores noires, la moitié de ces dernières sont de type sauvage et les autres possèdent le remaniement. Il suffit donc de repiquer deux par deux les spores noires extraites d'un asque (on sait que les spores sœurs sont identiques). Si l'asque a quatre spores viables, on obtient ainsi deux cultures pures que nous avons désignées par les symboles T-1 (α) et T-1 (α').

On constate alors que l'une d'entre elles, soit T-1 (α), est indistinguishable de la souche sauvage. En croisement avec bl_1 , elle donne une ségrégation régulière.

La deuxième souche, T-1 (α'), pousse plus lentement que la souche sauvage, mais elle en est indistinguishable morphologiquement. En croisement avec bl_1 , elle donne une ségrégation très irrégulière avec spores avortées.

Par conséquent, T-1 (α) est identique à la souche sauvage et T-1 (α') porte le remaniement chromosomique.

Nous ne nous sommes d'ailleurs pas limité à la dissection d'un seul asque. Dans tous les cas, les résultats ont été identiques : chaque asque renferme les deux types d'ascospores mentionnés plus haut.

Quant aux spores avortées, elles sont de deux types bien distincts : les unes sont blanches, les autres jaunes.

Ces spores sont incapables de germer. La différence de couleur tient certainement au fait que les spores blanches ont arrêté leur développement à un stade plus précoce que les spores jaunes.

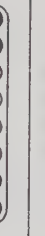
Il importe maintenant de savoir si nous avons affaire à une transloca-

TABLEAU 12 - EXEMPLES DE REMANIEMENTS CHROMOSOMIQUES -

T₁:

TYPES D' ASQUES											
FREQ.	143	95	110	79	91	83	97	65	58	17	20

201 :

TYPES D' ASQUES							
FREQ.	89	219	240	63	42	16	23

tion réciproque ou à une inversion. L'inversion paracentrique se trouve éliminée d'emblée parce qu'elle ne peut expliquer la présence de certains types d'asques dont les huit ascospores sont avortées. Au surplus, l'aspect des spores avortées est ici très régulier.

L'inversion péricentrique est éliminée aussi, car il faudrait supposer qu'il se produit fréquemment deux crossing-over dans l'inversion, tantôt d'un côté du centromère, tantôt de part et d'autre.

Il reste donc à examiner la troisième et dernière possibilité : la translocation réciproque. Nous constatons que les types observés sont en accord avec la théorie. En ce qui concerne les fréquences, nous voyons que la somme des types I, J et K (95) est à peu près égale au nombre d'asques de type B (95) et C (110). ($\chi^2_{(2)} = 1,5$; $0,30 < P < 0,50$).

Le type d'asque A provenant aussi bien d'une absence de crossing-over dans les régions *a* et *b* que de la présence d'un crossing-over dans chacune de ces zones, il n'est pas possible de faire la répartition de façon exacte. Tout au plus peut-on dire que, sur les 143 asques A, 100 environ résultent d'un crossing-over en *a* et en *b*. Le reste des asques de type A, soit environ 43, proviendrait d'une absence de crossing-over en *a* et en *b*.

Cette dernière éventualité serait aussi responsable de la production d'asques de types H (65). Malgré ce que prévoit la théorie, nous ne sommes pas parvenu à distinguer deux types d'asques dans cette catégorie. Il semble probable que cela signifie que le mode de ségrégation (I-II) $\longleftrightarrow$ (III-IV) n'a pas lieu.

Or, lorsqu'un crossing-over s'est produit soit en *a*, soit en *b*, soit à la fois en *a* et en *b*, la règle de Mc Clintock nous apprend que la ségrégation (I-II) $\longleftrightarrow$ (III-IV) est impossible.

Au total donc, cette ségrégation paraît ne jamais se réaliser.

En conclusion de cette étude de la souche T-I, il nous semble pouvoir affirmer qu'il s'agit bien d'une translocation réciproque.

2°) La souche 201

Cette souche a été isolée par les mêmes procédés que la précédente. Elle présente également tous les caractères d'un système auto-entretenu. Il s'agit donc, là encore, d'une translocation réciproque ou d'une inversion.

Tous les périthèces en disjonction renferment sept types d'asques, compte non tenu de l'orientation par rapport au sommet et à la base de l'asque (tabl. 12). Il n'y a qu'un seul type de spores avortées, hyalines. On note que les asques des types B et C renferment six spores noires.

Si l'on repique ces six spores par groupes de deux, on s'aperçoit que deux paires seulement sont capables de germer. De fait, en examinant ces asques un peu avant complète maturité, on constate que l'une des trois paires d'ascospores est légèrement moins colorée.

Les spores extraites des asques des types B et C donnent des cultures de deux sortes. Les unes sont identiques à la souche sauvage et donnent, en croisement avec bl₁, une ségrégation régulière. Les autres conduisent, dans les mêmes conditions, à la formation de spores avortées. Elles sont donc porteuses du remaniement.

Compte tenu des types d'asques observés et de leurs fréquences, il est facile de voir que nous sommes ici en présence d'une translocation inégale.

Etant donné que la fréquence globale (81) des types E, F et G est à peu près égale à celle (89) du type A ($\chi^2_{(1)} = 0,37$; $0,50 < P < 0,70$), il en résulte qu'en l'absence de crossing-over en *a* et en *b*, la ségrégation (I-IV) - (II-III), dite en festons, n'a pas lieu ; c'est probablement une conséquence de la forme particulière du tétravalent. Il est possible, d'ailleurs, que cette ségrégation ne se réalise dans aucun cas.

Enfin, l'absence totale d'asques dont les huit ascospores soient avortées montre qu'ici encore la ségrégation (I-II) $\longleftrightarrow$ (III-IV) n'a jamais lieu.

f) ETUDE QUANTITATIVE

Dans toutes nos recherches de mutants, nous avons irradié du mycélium au départ. En fait, on se bornait à prélever, dans une culture de la souche sauvage, un carré de gélose contenant des hyphes. Ce carré était irradié par les rayons X puis repiqué dans une boîte de Pétri renfermant soit du fumier de cheval, soit du milieu de Dodge au moût de maïs.

L'effet des rayons X étant pratiquement immédiat, les mutations sont induites, dans les noyaux des hyphes, au moment même de l'irradiation.

Plus tard, lorsque le carré de gélose est transféré sur un milieu nutritif vierge, les hyphes croissent et les noyaux qu'ils contiennent se multiplient. Il n'est pas douteux qu'il intervient alors un processus sélectif : certains noyaux, fortement touchés, doivent être incapables d'entrer en mitose ; d'autres ne peuvent sans doute se diviser qu'à une vitesse plus faible que celle des noyaux intacts. Au total, il semble probable que tous les noyaux présentant une délétion de quelque étendue sont éliminés. Il ne subsisterait alors que les remaniements chromosomiques n'ayant entraîné aucune perte de chromatine, à savoir les inversions et les translocations réciproques.

Lorsque le mycélium a envahi toute la boîte de Pétri, des ébauches de périthèces se forment en périphérie. Nous verrons plus tard qu'on est conduit à admettre qu'il n'y a que deux noyaux à l'origine du bouquet d'asques contenu dans un périthèce.

S. macrospora étant homothallique, les lois du hasard vont évidemment s'appliquer au moment de la constitution des paires de noyaux. Ainsi, un certain noyau initial M₁ pourra, s'il est multiplié, conduire à des bouquets

TABLEAU 13_

POURCENTAGE DE BOUQUETS D'ASQUES EN DISJONCTION
(AVEC SPORES AVORTEES) EN FONCTION DE LA DOSE

1_HYPHES ISSUS D'UNE CULTURE AGEES DE 24 HEURES :

TEMPS D'IRRADIATION EN MINUTES	NOMBRE DE BOUQUETS D'ASQUES INTACTS	NOMBRE DE BOUQUETS D'ASQUES EN DISJONCTION	% DE BOUQUETS EN DISJONCTION	DOSE EN ROENTGENS
15	462	17	$3,5 \pm 0,8$	5.250
30	546	41	7 ± 1	10.500
45	499	27	$5,1 \pm 0,9$	15.750
55	590	35	$5,6 \pm 0,9$	19.250
65	720	50	$6,5 \pm 0,9$	22.250
75	344	27	$7,3 \pm 1,3$	26.250

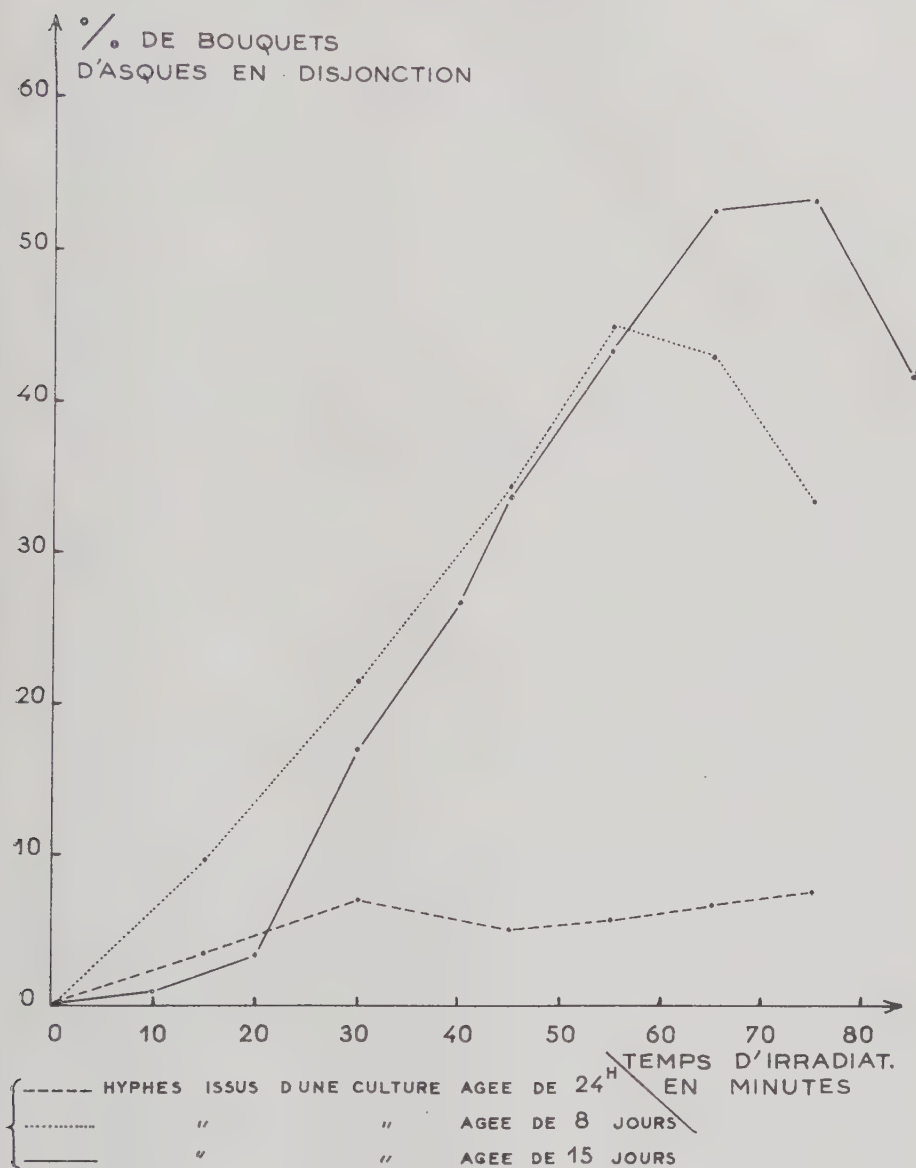
2_HYPHES ISSUS D'UNE CULTURE AGEES DE 8 JOURS :

15	519	56	$9,7 \pm 1,2$	5.250
30	498	167	$25,1 \pm 1,7$	10.500
45	293	154	$34,4 \pm 2,2$	15.750
55	279	229	$45,1 \pm 2,2$	19.250
65	309	234	$43,1 \pm 2,1$	22.750
75	449	227	$33,6 \pm 1,8$	26.250

3_HYPHES ISSUS D'UNE CULTURE AGEES DE 15 JOURS :

10	726	7	$0,9 \pm 0,3$	3.500
20	580	20	$3,3 \pm 0,7$	7.000
30	239	49	$17,0 \pm 2,2$	10.500
40	273	99	$26,6 \pm 2,3$	14.000
45	150	77	$33,9 \pm 3,1$	15.750
55	175	135	$43,5 \pm 2,8$	19.250
65	219	246	$52,9 \pm 2,3$	22.750
75	211	243	$53,5 \pm 2,3$	26.250
85	351	253	$41,9 \pm 2$	29.750

TABLEAU 14 - POURCENTAGE DE BOUQUETS
D'ASQUES EN DISJONCTION EN FONCTION
DE LA DOSE



d'asques hybrides M_1N (N = noyau de type sauvage) ou purs (M_1M_1). Il pourra aussi éventuellement donner un bouquet d'asques M_1M_2 , M_2 étant un autre noyau mutant, etc...

La situation est donc, au total, extrêmement complexe. Cependant, en laissant de côté les mutations géniques, qui sont relativement très rares, et en ne considérant que les remaniements chromosomiques, il est clair que les bouquets d'asques M_1N , M_1M_2 , etc... montreront des disjonctions avec spores avortées. Au contraire, les bouquets d'asques MN , M_1M_1 , M_2M_2 , seront d'aspect normal (chaque asque contiendra huit spores noires viables).

Il était intéressant de rechercher de quelle façon le pourcentage de bouquets d'asques en disjonction (avec spores avortées) varie en fonction de la dose, exprimée en roentgens.

Il est rapidement apparu que l'état des hyphes, dans le fragment de gélose irradié, avait une grande importance. En effet, ce carré de gélose peut être prélevé à la périphérie d'une culture en croissance et contenir, de ce fait, des noyaux en voie d'active division mitotique. Il peut aussi provenir de cultures plus âgées, ayant terminé presque totalement leur croissance, ou bien encore être issu de vieilles cultures où l'on peut être assuré qu'une fraction importante des noyaux est au repos.

Trois expériences distinctes ont donc été réalisées, en irradiant respectivement :

1. carré de gélose issu d'une culture âgée de vingt-quatre heures (hyphes en voie de croissance active) ;
2. carré de gélose issu d'une culture âgée de huit jours (croissance presque achevée) ;
3. carré de gélose issu d'une culture âgée de quinze jours (croissance terminée).

Les résultats sont ceux indiqués sur les tableaux 13 et 14. Les différences dans la forme des trois courbes sont particulièrement frappantes. On remarque que :

a) Le pourcentage de bouquets d'asques en disjonction est beaucoup plus faible dans le cas où les hyphes sont en voie de croissance active (noyaux en mitose) au moment de l'irradiation.

b) Il existe un maximum auquel il convient de donner une interprétation. En effet, *a priori*, on pourrait s'attendre à ce que le pourcentage de bouquets d'asques en disjonction tende vers 100 % aux doses les plus élevées.

Une courbe à maximum du même type a été antérieurement obtenue par HOLLAENDER, SANSOME, ZIMMER et DEMEREC (83, 148) pour le pourcentage de mutations en fonction de la dose d'ultra-violet, chez l'Ascomycète *Neurospora crassa*. Essayant d'expliquer ces résultats, les auteurs précédents supposent que l'ultra-violet a une double action : d'une part sur le cytoplasme ; d'autre part sur les chromosomes. L'effet cytoplasmique augmen-

terait avec la dose d'une façon cumulative. Dans un cytoplasme ainsi détérioré, les noyaux mutants auraient moins de chances de survivre que les noyaux normaux. Cet effet différentiel serait d'autant plus marqué que la dose (donc la détérioration du cytoplasme) est plus élevée. On comprendrait ainsi pourquoi, aux hautes doses, le pourcentage de mutations diminue.

Par ailleurs, KOLMARK (88), traitant des conidies de *Neurospora crassa* par le diméthyle sulfate et le diéthyle sulfate, et étudiant le pourcentage de mutations réverses pour deux loci (ad^- , $inos^-$) en fonction du temps de traitement, a obtenu, chaque fois, une courbe présentant un maximum. Dans ces expériences, le pourcentage de conidies survivantes a été calculé dans chaque cas. Ainsi, pour le diéthyle sulfate, la fréquence de mutation $ad^- \longrightarrow ad^+$ passe par un maximum, lorsqu'il y a environ 70 % de conidies survivantes. Au contraire, pour la mutation $inos^- \longrightarrow inos^+$, le maximum est atteint pour un pourcentage de conidies survivantes voisin de 20 %.

SRB (157) a obtenu également une courbe présentant un maximum, chez la levure *S. cerevisiae*, pour le pourcentage de mutations conférant la résistance à la canavanine, induites par la Béta-propiolactone.

EHRENBERG (49) a trouvé aussi des courbes à maxima chez l'orge, pour le pourcentage de mutations chlorophylliennes, en fonction de la dose de rayons X.

Cependant, ni KOLMARK, ni SRB, ni EHRENBERG n'ont cherché à interpréter la signification de ces maxima.

Par contre, D. D. PITTMAN (122), travaillant sur *Saccharomyces*, a montré que les cellules en voie de division sont plus résistantes aux radiations (rayons X) que les cellules au repos. Les cellules en mitose donnent en outre, pour une même dose, un pourcentage de mutations plus faible. Il en résulte que, lorsqu'on augmente la dose, le pourcentage de mutations passe par un maximum.

Nos propres résultats sur *Sordaria macrospora* sont difficiles à interpréter en raison des phénomènes très complexes de sélection entre noyaux dont les hyphes sont vraisemblablement le siège après l'irradiation.

L'absence totale de conidies chez cette espèce ne permet pas une étude expérimentale détaillée sur ce point.

Enfin, au total, les courbes que nous avons obtenues ne nous donnent aucune indication directe sur le pourcentage de remaniements chromosomiques induits en fonction de la dose.

CHAPITRE IV

ETUDE DE L'ACTIVITE MUTAGENE DE DIVERSES SUBSTANCES

Compte tenu des résultats que nous venons d'exposer sur l'action génétique des radiations chez *Sordaria macrospora*, il nous a semblé intéressant de rechercher s'il était possible d'induire des mutations, chez cet organisme, à l'aide de diverses substances.

Dans cette étude, nous avons poursuivi trois objectifs principaux :

1. Nous avons essayé d'obtenir des formes polyploïdes, dont le mycélium aurait renfermé des noyaux diploïdes à $2n$ chromosomes.

2. Nous avons recherché de nouvelles substances mutagènes, en étudiant systématiquement un certain nombre de corps. Nous pensions *a priori* trouver des substances susceptibles d'induire des mutations géniques et des remaniements chromosomiques, et nous nous sommes proposé de comparer les mutations obtenues de cette façon à celles induites par les rayons X.

3. Considérant les modifications cytoplasmiques permanentes qui ont été induites sous l'action de l'euflavine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* par EPHRUSSI, SLONIMSKI et leurs collaborateurs (17, 50 à 56, 103, 154 à 156), nous avons pensé qu'il serait peut-être possible d'obtenir des mutations du même ordre chez *S. macrospora*.

1. — ESSAIS D'INDUCTION DE POLYPLOIDIE

Des tentatives en vue d'obtenir des formes polyploïdes chez les Ascomycètes ont été faites à diverses reprises.

Le premier travail dans ce sens semble bien être celui de BAUCH (6). Opérant sur la levure, cet auteur a étudié l'activité d'un grand nombre de substances, parmi lesquelles le camphre et l'acénaphène. A l'aide de ces deux derniers corps, il est parvenu à obtenir des formes géantes de levures qui sont probablement des polyploïdes. Toutefois, aucune analyse cytologique ou génétique n'a été réalisée.

GORDON et Mc KECHNIE (67) ont prétendu qu'ils étaient parvenus, grâce à l'action de la colchicine, à obtenir des polyploïdes chez *Penicillium notatum*.

Cependant, l'année suivante, SANSOME et BANNAN (149) établissaient que la colchicine était inactive sur cet organisme. Simultanément SANSOME réussissait à obtenir des mutants à grosses conidies (probablement diploïdes) après traitement par le camphre.

On doit à ROPER (140), PONTECORVO (131), PONTECORVO et ROPER (134) l'isolement de formes diploïdes chez *Aspergillus nidulans* et *A. niger*. La méthode ingénieuse utilisée par ces auteurs mérite d'être mentionnée. Ils partent d'un hétérocaryote balancé entre deux souches présentant chacune une déficience biochimique particulière. Cet hétérocaryote est capable de croître sur le milieu minimum, en raison des phénomènes de dominance que nous avons précédemment mentionnés. Il forme des conidies uniucléées que l'on peut recueillir et réensemencer sur le milieu minimum. Dans leur immense majorité, ces conidies sont incapables de pousser sur ce milieu, car leur noyau est porteur d'une déficience biochimique (de l'une ou de l'autre sorte). Si cependant un noyau diploïde hétérozygote a pris naissance par fusion de deux noyaux (un de chaque type parental), la conidie qui renfermera ce noyau sera susceptible de croître sur le milieu minimum. Elle donnera une colonie diploïde qui sera immédiatement détectable.

Les précédents auteurs ont utilisé aussi des gènes commandant la couleur des conidies pour faciliter l'isolement des diploïdes. La souche sauvage d'*Aspergillus nidulans* a des conidies vertes, mais on connaît deux mutants récessifs ayant respectivement des conidies blanches et jaunes. On peut alors réaliser un hétérozygote balancé entre deux de ces mutants. Les conidies hétérocaryotiques diploïdes seront vertes. Dans ces conditions, il n'est même plus nécessaire d'ensemencer les conidies produites par l'hétérocaryote ; occasionnellement, on rencontre dans la culture un secteur vert à partir duquel il est facile d'isoler une souche diploïde.

L'expérience prouve que des noyaux diploïdes prennent naissance spontanément, mais avec une fréquence extrêmement faible. On peut l'augmenter notablement en traitant l'hétérocaryote par des vapeurs de camphre.

Les souches diploïdes produisent des conidies nettement plus grosses que celles des souches haploïdes. En outre, alors que les souches types d'*A. nidulans* forment des asques octosporés, tous les diploïdes ont des asques à seize spores. Les raisons de cette modification sont inconnues.

Les ascospores diploïdes n'ont qu'un faible pouvoir germinatif (1 sur 50), ce qui interdit toute analyse génétique individuelle des asques.

Le caractère le plus singulier des souches diploïdes hétérozygotes est l'existence de crossing-over somatiques. Ce phénomène a fait l'objet de recherches étendues de PONTECORVO et ROPER.

Après de nombreuses tentatives infructueuses, SANSOME (147) est parvenue, de son côté, à obtenir des formes diploïdes chez *Neurospora*. Elle a utilisé une souche particulière ne produisant pas de macroconidies, mais

uniquement des microconidies uninucléées. Elle a employé deux techniques de traitement :

1) On incorpore du camphre au milieu de culture, à la dose de 60 mg/20 cm³. On observe un ralentissement considérable de la croissance du mycélium. Dès que des conidies se forment, elles sont réensemencées sur un milieu normal, et celles qui germent sont repiquées isolément.

2) On place, au-dessus du bouchon de coton fermant le tube de culture, un morceau de camphre enveloppé dans de la cellophane. Ce camphre est ensuite recouvert avec une feuille d'aluminium. Les conidies qui se forment sont repiquées comme précédemment.

Dans ces conditions, SANSOME est parvenue à obtenir des cultures monospores portant des conidies nettement plus grosses que celles du type de départ. En croisant des souches diploïdes + et —, elle a réussi à obtenir des asques dont le noyau de fusion était soit 3n, soit 4n. Très souvent, de tels asques contiennent plus de huit ascospores. On retrouve ainsi le caractère rencontré chez *Aspergillus nidulans* diploïde.

En outre, les cultures diploïdes sont très instables et redonnent spontanément des formes haploïdes.

Nous avons à notre tour cherché à obtenir des formes diploïdes chez *S. macrospora*. En effet, un certain nombre de questions importantes restent à étudier chez les diploïdes, en particulier : leur comportement cytotologique ; les raisons pour lesquelles il se forme seize ascospores au lieu de huit ; la ségrégation dans les asques individuels ; le crossing-over mitotique.

Nous avons vu que, chez *A. nidulans*, une ascospore seulement sur cinquante est capable de germer, ce qui interdit toute analyse génétique individuelle des asques. Chez *S. macrospora*, il semblait qu'une telle analyse serait néanmoins possible en ce qui concerne les gènes autonomes commandant la couleur de l'ascospore puisqu'ici le simple examen microscopique d'un asque suffit à déterminer le mode de ségrégation.

Nous avons essayé les substances suivantes dont l'activité mitoclasique, chez les végétaux supérieurs, est bien connue :

1°) Colchicine. — Elle a été incorporée au milieu de culture à la dose de 1 ‰. La croissance et la fructification du mycélium n'ont été en aucune façon ralenties. Aucune ascospore et aucun asque aberrants n'ont été observés.

2°) Thiocolchicine. — Cet alcaloïde, récemment synthétisé par VELLUZ et MULLER (163), a une très grande activité sur les végétaux, comme cela a été établi par FERRARY (58). Sur *S. macrospora* son action est nulle.

3°) Paradichlorobenzène. — Substance peu soluble que nous avons incorporée à saturation dans le milieu de culture.

Les résultats ont été négatifs.

4°) Bromonaphtalène. — Résultats négatifs.

5°) Acénaphène. — Ce corps a permis d'obtenir des formes polyploïdes chez les levures, aussi l'avons-nous soumis à une série d'essais détaillés. En pratique, les méthodes de traitement ont été de deux sortes : ou bien cette substance (très peu soluble dans l'eau) a été incorporée au milieu de culture sous forme pulvérulente, ou bien nous avons fait agir des vapeurs d'acénaphène sur du mycélium en croissance.

Ces traitements se traduisent en général par un ralentissement considérable de la croissance du mycélium. Après une longue période de latence, il finit par se former des périthèces. Malgré le très grand nombre d'essais que nous avons réalisés, tous les asques et ascospores formés dans ces conditions ont été absolument normaux.

6°) Camphre. — Nous avons vu que ce corps a permis d'obtenir des types polyploïdes chez les levures, chez *Penicillium notatum*, *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *Neurospora crassa*. Son activité sur les Ascomycètes ne saurait être mise en doute. Pour cette raison, il nous a paru nécessaire de réaliser de nombreux essais, dans des conditions aussi variées que possible. Comme l'acénaphène, ce corps est insoluble dans l'eau. Nous l'avons donc incorporé au milieu sous forme pulvérulente, à des concentrations variant entre 5 mg et 500 mg pour 100 cm³ de milieu. Aux concentrations les plus élevées, le mycélium est tué. Aux concentrations les plus faibles, la croissance et la fructification s'effectuent normalement. Entre ces deux extrêmes, les concentrations médianes entraînent un ralentissement considérable de la croissance du mycélium. Toutefois, les périthèces qui se forment renferment des asques et des spores normaux.

Nous avons réalisé aussi des traitements sous forme de vapeurs. Pour cela, le camphre est dissous dans de l'éther et ce dernier est versé dans un couvercle de boîte de Pétri. En s'évaporant, il laisse déposer des cristaux de camphre. Ce couvercle peut alors servir à traiter des cultures de *S. macrospora* à des stades divers de développement et pendant des temps variés. Un traitement de une à deux heures au moment où s'effectue la méiose se traduit par la formation d'un certain pourcentage d'asques anormaux ne renfermant que quatre spores. Un grand nombre de ces spores ont été repiquées en milieu normal, mais nous n'avons obtenu que des cultures conformes au type sauvage.

Au total, par conséquent, le camphre ne nous a donné que des résultats entièrement négatifs, comme les autres substances que nous avons essayées.

Il importe de rechercher les raisons de cet échec. La première résulte essentiellement de ce que *S. macrospora*, contrairement à *Penicillium*, *Aspergillus* et *Neurospora*, ne forme pas de conidies. Il s'ensuit que les noyaux issus du traitement ne peuvent être isolés immédiatement. On en

est donc réduit à appliquer des traitements moins énergiques qui permettent encore au mycélium de former des asques. On peut alors repiquer les ascospores, dont les deux noyaux sont — nous le savons — génétiquement identiques.

La deuxième cause d'échec peut fort bien résulter d'une instabilité très marquée des noyaux diploïdes. Chez *Aspergillus nidulans*, ROPER et PONTECORVO ont signalé que les diploïdes donnaient spontanément des secteurs haploïdes. Ce phénomène a été retrouvé par SANSOME, chez *Neurospora crassa*, sous une forme encore plus accusée.

Nous pouvons supposer que cette instabilité atteint un degré très élevé chez *S. macrospora*. Certains faits expérimentaux viennent d'ailleurs à l'appui de cette hypothèse. Considérons, en effet, la souche as-1 précédemment décrite. Nous savons qu'en prophase I les quatorze chromosomes restent à l'état d'univalents. Par suite d'un comportement aberrant des centrosomes, les divisions nucléaires qui ont lieu dans l'asque sont très anormales et une fraction importante des ascospores avortent. Certaines cependant sont viables, et l'on peut constater qu'elles sont notablement plus grosses ($d = 26,3 \mu$) que celles de la souche sauvage ($d = 21,2 \mu$). Ce caractère de taille, joint au fait qu'aucune réduction chromatique n'a lieu dans l'asque, impose la conclusion que ces ascospores renferment deux noyaux diploïdes.

Cependant, si l'on confronte as-1 et hl-1, on obtient des asques hybrides renfermant huit ascospores de taille normale, dont quatre noires et quatre blanches. Ce nombre de spores et cette régularité prouvent que le noyau de fusion de l'asque hybride est diploïde (et non triploïde). On est donc obligé d'admettre que le caractère diploïde de la souche as-1 est instable. Au moment de la germination des ascospores, les deux noyaux diploïdes doivent donner spontanément naissance à des noyaux haploïdes.

Bien entendu, l'instabilité évidente de la souche as-1 ne nous autorise pas à conclure qu'il en est obligatoirement de même des noyaux diploïdes issus de la souche sauvage. C'est pourquoi nous nous garderons de conclure que la synthèse d'une souche diploïde de *S. macrospora* est impossible.

2. — RECHERCHE DE SUBSTANCES MUTAGENES

Quatre groupes distincts de substances ont été étudiés, à savoir :

- a) l'acridine et certains de ses dérivés ;
- b) un groupe hétérogène comprenant des corps voisins de l'acridine et certains autres résultant d'une simplification de sa molécule ;
- c) des dérivés de la thiourée ;
- d) des phénylcarbammates.

Examinons successivement ces quatre groupes :

a) ACRIDINE ET DÉRIVÉS (tableau 15)

L'activité mutagène de certaines de ces substances a déjà été démontrée. En particulier, D'AMATO (22 à 25) a établi que certains dérivés aminés de l'acridine sont capables de provoquer des ruptures de chromosomes chez *Allium cepa* et d'induire des mutations géniques chez l'orge. En outre, EPHRUSSI, SLONIMSKI et leurs collaborateurs (17, 50 à 56, 103, 154 à 156), ont montré que l'euflavine agit sur *Saccharomyces cerevisiae* en induisant la formation d'un mutant à croissance lente. Celle-ci résulte de ce que les cellules sont incapables d'utiliser le glucose par voie respiratoire en raison de l'absence de deux enzymes essentiels, la cytochrome oxydase et la succinodéshydrogénase.

L'analyse génétique des mutants à croissance lente a révélé que ce caractère résultait non pas d'une mutation génique, mais d'une modification du cytoplasme. En particulier, le croisement d'une levure normale avec une levure à croissance lente donne une descendance entièrement normale.

Ces importants résultats nous ont incité à réétudier l'action de l'acridine et d'un certain nombre de ses dérivés — en tout dix-neuf substances — sur *S. macrospora*.

I) *Acridine* :

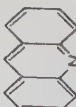
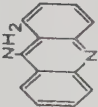
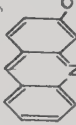
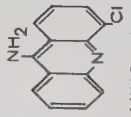
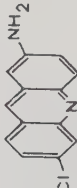
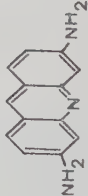
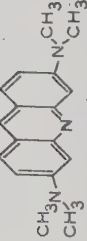
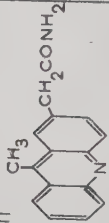
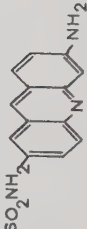
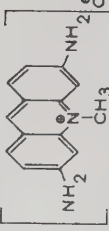
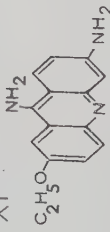
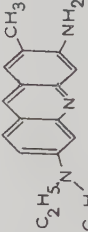
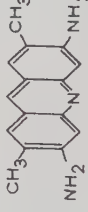
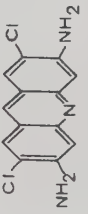
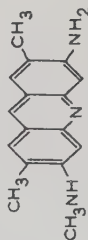
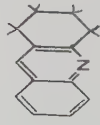
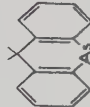
Nous l'avons incorporée au milieu de culture (milieu de Dodge au moût de maïs) à la concentration de 3 mg pour 100 cm³. Dans ces conditions, la croissance du mycélium est très fortement ralentie. Le mycélium finit par s'arrêter complètement de croître et par mourir, dans un délai d'une quinzaine de jours après le début de l'expérience. Toutefois, on constate qu'il se développe en divers points des colonies mycéliennes de taille et d'aspect très variés, mais généralement punctiformes au départ.

Il est facile d'effectuer des prélèvements dans ces colonies et de transférer le mycélium en milieu normal sans acridine. Dans ces conditions, on constate que les transferts donnent naissance à des colonies dont la vitesse de croissance, lente ou très lente, est très inférieure à celle du type sauvage initial.

Un certain nombre de variants ont été isolés de cette façon. Ils conservent leurs caractères au cours des repiquages successifs et peuvent être identifiés par leur vitesse de croissance et la morphologie de leur mycélium. Au total, vingt variants distincts ont été isolés. Nous en donnerons plus tard une description précise, en même temps que nous indiquerons les méthodes d'analyse génétique qui ont permis d'établir qu'il s'agissait sans exception de mutations géniques simples.

Le nombre des colonies mutantes par boîte de Pétri (D = 10 cm) peut atteindre vingt et même plus. Il serait facile d'isoler, en un temps très court, plusieurs centaines de mutants distincts.

TABLEAU 15_

I		ACRIDINE	II		5-AMINO ACRIDINE	III		2-CHLORO ACRIDINE	IV		5-AMINO 1-CHLORO ACRIDINE	V		3-AMINO 8-CHLORO ACRIDINE
VI		PROFLAVINE (2,8 DIAMINO ACRIDINE)	VII		ORANGE D'ACRIDINE (2,8 bis DIMETHYLAMINO ACRIDINE)	VIII		3-ACETAMIDO 5-METHYL ACRIDINE	IX		2-AMINO 7-SULFAMIDE ACRIDINE	X		EUFLAVINE
XI		RIVANOL (2,5-DIAMINO 7-ETHOXY ACRIDINE)	XII		2-AMINO 8-DIETHYLAMIDO 3-METHYL ACRIDINE	XIII		JAUNE D'ACRIDINE (2,8 DIAMINO 3,7 DIMETHYL ACRIDINE)	XIV		2,8 DIAMINO 3,7 DICHLORO ACRIDINE	XV		2-AMINO 3,7 DIMETHYL 8-METHYLAMINO ACRIDINE
XVI		1,2,3,4 TETRAHYDRO ACRIDINE	XVII		OCTAHYDRO ACRIDINE SYMETRIQUE	XVIII		ARSACRIDINE	XIX		5,5' DIACRIDYL			

Les propriétés de l'acridine paraissant tout à fait exceptionnelles, nous avons été amené à rechercher si certains de ses dérivés avaient une activité comparable ou plus grande. Nous avons donc testé un certain nombre de dérivés commerciaux (II, V, VII, X, XI, XIII). D'autres substances nous ont été obligeamment fournies par le Professeur A. ALBERT (III, IV, VIII, IX, XII, XIV, XV, XVI, XVII, XIX). Enfin, M. MONARD, chimiste au Centre d'Etude du Bouchet, a bien voulu mettre à notre disposition l'arsacridine (XVIII).

Chacun de ces corps a fait l'objet d'une étude précise. Nous avons fait varier largement les concentrations et les durées de traitement. Cependant, aucune des dix-huit substances essayées n'a montré d'activité comparable, même de loin, à celle de l'acridine. Les résultats ont été les suivants :

II) *5-Amino acridine* :

Est susceptible de ralentir considérablement la croissance du mycélium. Cependant, aucune colonie mutante n'apparaît. Le mycélium traité, transféré en milieu normal, fructifie sans montrer de mutations. Ce corps peut donc être considéré comme inactif.

III) *2-Chloro acridine* :

Résultats identiques à ceux obtenus avec le corps précédent.

IV) *5 Amino 1-chloro-acridine* :

Ce dérivé est nettement mutagène, en ce sens qu'il est susceptible d'induire des cassures chromosomiques. Ce fait est établi par la formation de périthèces contenant des bouquets d'asques en disjonction (avec spores avortées) dans les cultures traitées. Cependant, aucun mutant à croissance lente, comparable à ceux obtenus avec l'acridine, n'a été observé.

V) *Proflavine* (sulfate de 2-8 diamino acridine) :

Cette substance est mutagène au même titre que la précédente.

VI) *3 Amino 8-Chloro acridine* :

Inactif.

VII) *Orangé d'acridine* (2-8 bis diméthyl amino acridine) :

Inactif.

VIII) *3-Acétamido 5-méthyl acridine* :

Inactif.

IX) *2-Amino 7-sulfamide acridine* :

Inactif.

X) *Euflavine* (2-8 diamino N-méthyl acridinium) :

Cette substance, rappelons-le, a permis à EPHRUSSI d'obtenir des mutants à croissance lente chez *Saccharomyces cerevisiae*. Il s'agit d'une modification cytoplasmique.

Sur *S. macrospora*, ce corps s'est révélé incapable d'induire des mutations géniques. Par contre, on obtient un mycélium stérile à croissance lente irrégulière, caractère dont le mode d'hérédité est cytoplasmique. Ces résultats feront ultérieurement l'objet d'une discussion approfondie.

XI) *Rivanol* (lactate de 2-5 diamino 7-éthoxy acridine) :

Inactif.

XII) 2-amino 8-diéthylamido 3-méthyl acridine :

Ce dérivé s'avère faiblement mutagène, car il est capable de provoquer des cassures chromosomiques, au même titre que les corps IV et V.

XIII) *Jaune d'acridine* (2-8 diamino 3-7 diméthyl acridine) :

Inactif.

XIV) 2-8-diamino 3-7 dichloro acridine :

Ce corps s'avère mutagène, au même titre que les substances IV, V, XII.

XV) 2-amino 3-7 diméthyl 8-méthylamino acridine :

Inactif.

XVI) 1-2-3-4 tétrahydroacridine :

Inactif.

XVII) *Octahydroacridine symétrique* :

Inactif.

XVIII) *Arsacridine* :

Inactif.

XIX) 5,5'-diacridyl :

Inactif.

b) SUBSTANCES APPARENTÉES A L'ACRIDINE (tableau 16)

Comme nous l'avons déjà signalé, ce groupe est très hétérogène. Notre but a été d'étudier les substances voisines de l'acridine (benzoquinoléines, phénanthridine, benzacridines, phénazine) et celles résultant d'une sim-

plification de la molécule (carbazol, diphénylamine, aniline, quinoléine, pyridine), en vue de rechercher si certaines d'entre elles avaient des propriétés identiques. Nous avons obtenu les résultats suivants :

XX) *5-6 Benzoquinoléine* :

Ce corps s'est montré presque inactif. Aucun mutant à croissance lente n'a été obtenu.

XXI) *1-Amino 3-Méthyl Benzo-f-quinoléine* :

Il s'agit d'un dérivé substitué du précédent, fourni par le Professeur A. ALBERT. Ce corps est capable d'induire des cassures chromosomiques, se traduisant par l'apparition de bouquets d'asques en disjonction (avec spores avortées).

XXII) *7-8 Benzoquinoléine* :

S'est montré faiblement mutagène. Cependant, aucun mutant à croissance lente n'a été obtenu.

XXIII) *2-Amino 4-méthyl Benzo-h-quinoléine* :

Dérivé substitué du précédent, fourni par le Professeur A. ALBERT. S'est montré inactif.

XXIV) *3-Nitro Benzo-g-quinoléine* :

Substance ayant la même origine que la précédente. S'est montrée faiblement mutagène (remaniements chromosomiques).

XXV) *Phénanthridine* :

Très faible action mutagène (cassures chromosomiques).

XXVI) *8-9 Benzacridine* :

Ce corps, ainsi que les deux suivants, nous ont été fournis par M. ROYER, Directeur du Laboratoire de Synthèse organique de l'Institut du Radium. Il s'est montré inactif.

XXVII) *2-5 diméthyl 6-7 Benzacridine* :

Inactif.

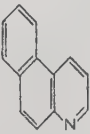
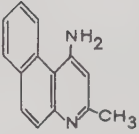
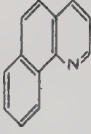
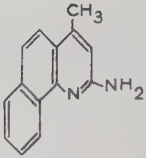
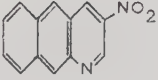
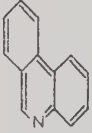
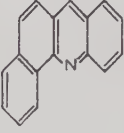
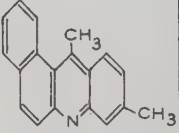
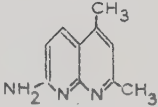
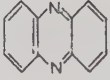
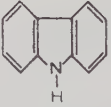
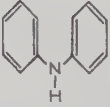
XXVIII) *7-amino 2-4 diméthyl 1-8 Naphthyridine* :

Ce corps est mutagène. Il est susceptible d'induire des cassures chromosomiques.

XXIX) *Phénazine* :

Cette substance est également mutagène (cassures chromosomiques).

TABLEAU 16_

XX  5,6 BENZOQUINOLEINE	XXI  1-AMINO 3-METHYL BENZO-f-QUINOLEINE	XXII  7,8 BENZOQUINOLEINE	XXIII  2-AMINO 4-METHYL BENZO-h-QUINOLEINE
XXIV  3-NITRO BENZO-g-QUINOLEINE	XXV  PHENANTHRIDINE	XXVI  8,9 BENZACRIDINE	XXVII  2,5 DIMETHYL 6,7 BENZACRIDINE
XXVIII  7-AMINO 2,4 DIMETHYL 1,8 NAPHTHYRIDINE	XXIX  PHENAZINE	XXX  CARBAZOL	XXXI  DIPHENYLAMINE
XXXII  ANILINE	XXXIII  QUINOLEINE	XXXIV  8-HYDROXY QUINOLEINE	XXXV  PYRIDINE

XXX) *Carbazol* :

Inactif.

XXXI) *Diphénylamine* :

Inactif.

XXXII) *Aniline* :

Inactif.

XXXIII) *Quinoléine* :

Inactif.

XXXIV) *8-hydroxyquinoléine* :

Inactif.

XXXV) *Pyridine* :

Faiblement mutagène (cassures chromosomiques).

Au total, nous constatons qu'aucun dérivé substitué de l'acridine ne possède une activité mutagène comparable à l'acridine elle-même. Il en est de même pour les seize substances apparentées dont nous avons fait l'étude.

Au terme de cet examen, l'acridine reste donc la seule substance identifiée possédant les propriétés mutagènes très particulières, que nous avons mentionnées plus haut.

c) DÉRIVÉS DE LA THIOURÉE (tableau 17)

Les six corps dont nous avons fait l'étude nous ont été fournis par M. MONARD, chimiste au Centre d'Etude du Bouchet. Ce sont les suivants :

XXXVI) *Allylthiourée* :

Inactif.

XXXVII) *Diallylthiourée* :

Inactif.

XXXVIII) *Allyléthylthiourée* :

Inactif.

XXXIX) *Allylphénylthiourée* :

Inactif.

XL) *Allylthiosemicarbazide* :

Cette substance a une activité mutagène particulièrement marquée. Cependant, la solution aqueuse, inodore au moment de sa préparation, acquiert rapidement une forte odeur de moutarde, et il semble bien que le corps actif soit un produit de dégradation qui n'a pas été identifié.

Quoi qu'il en soit, le mycélium de *S. macrospora* qui a subi l'action de l'allylthiosemicarbazide donne naissance à des périthèces contenant des bouquets d'asques dont certains sont en disjonction. Parmi ces derniers, la moitié environ contiennent des spores avortées et correspondent à des remaniements chromosomiques. Quant aux autres, il s'agit de disjonction de couleur d'ascospore, traduisant des mutations géniques.

Nous sommes parvenu à isoler les mutants suivants :

- deux mutants distincts à spores jaunes, qui sont allèles de j_2 ;
- un mutant à spores roses, allèle de r_1 ;
- un mutant à spores beiges, apparemment allèle de bl_1 . Nous nous proposons de préciser plus tard la véritable nature de ce mutant (be_2) ;
- un mutant dont les asques renferment plus de huit spores. C'est un allèle de $sps-1$.

Bien que le nombre de mutants soit faible, il semble bien que l'allylthiosemicarbazide n'ait pas une action spécifique.

Il est intéressant de remarquer que la proportion relative des mutations géniques et des remaniements chromosomiques est ici très différente de ce que l'on obtient avec les rayons X. Dans ce dernier cas, en effet, les remaniements sont beaucoup plus fréquents que les mutations géniques.

XLI) *Allylsénévol* :

C'est l'essence de moutarde. AUERBACH et ROBSON (3, 4) ont antérieurement démontré que ce composé était faiblement mutagène. Nos essais sur *S. macrospora* aboutissent à la même conclusion. Les proportions relatives de remaniements chromosomiques et de mutations géniques sont du même ordre qu'avec l'allylthiosemicarbazide.

Nous avons obtenu trois mutants à spores blanches, d'origine distincte, qui se sont révélés être allèles de bl_1 .

d) PHÉNYLCARBAMATES (tableau 17)

Nous avons étudié les corps :

- XLII) *Phénylcarbamate de 2-5 diméthyl-4 chlorophénoxy éthyle*.
- XLIII) *Phénylcarbamate de 5-indanyle*.
- XLIV) *Phénylcarbamate de 2-méthyl 3-4-5-6 tétrachlorophényle*.
- XLV) *Phénylcarbamate de 2-méthyl 4-chlorophényle*.

Toutes ces substances sont dépourvues d'activité mutagène

TABLEAU 17_

XXXVI $\text{SC} \begin{cases} \text{NH}_2 \\ \text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2 \end{cases}$ ALLYLTHIOUREE	XXXVII $\text{SC} \begin{cases} \text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2 \\ \text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2 \end{cases}$ DIALYLTHIOUREE	XXXVIII $\text{SC} \begin{cases} \text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2 \\ \text{NH-C}_2\text{H}_5 \end{cases}$ ALLYLETHYLTHIOUREE
XXXIX $\text{SC} \begin{cases} \text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2 \\ \text{NH-C}_6\text{H}_5 \end{cases}$ ALLYLPHENYLTHIOUREE	XL $\text{SC} \begin{cases} \text{NH-CH}_2\text{-CH=CH}_2 \\ \text{NH-NH}_2 \end{cases}$ ALLYLTHIOSEMICARBAZIDE	XLI $\text{SC=N-CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ALLYLSENEVOL
XLII $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHCO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O-} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---} \text{C}_6\text{H}_3 \text{---} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{Cl}$ PHENYL CARBAMATE DE β(2,5 DIMETHYL 4-CHLOROPHENOXY)ETHYLE		XLIII $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHCO}_2\text{-} \begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{---} \text{C}_8\text{H}_6 \text{---} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$ PHENYL CARBAMATE DE 5-INDANYLE
XLIV $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHCO}_2\text{-} \begin{array}{c} \text{Cl} \quad \text{Cl} \\ \quad \\ \text{---} \text{C}_6\text{H}_2 \text{---} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{Cl} \end{array}$ PHENYL CARBAMATE DE 2-METHYL 3,4,5,6 TETRACHLORO PHENYLE		XLV $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHCO}_2\text{-} \begin{array}{c} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{Cl}$ PHENYL CARBAMATE DE 2-METHYL 4-CHLORO PHENYLE

3. — MUTATIONS INDUITES PAR L'ACRIDINE

a) MODALITÉS D'ACTION

Nous avons déjà décrit la technique d'isolement qui consiste à faire des prélèvements dans les colonies mutantes, le repiquage ayant lieu en milieu normal sans acridine.

Il est important de chercher à préciser l'origine et la nature de ces mutations.

Une première hypothèse, qui vient immédiatement à l'esprit, est qu'il s'agit de mutations spontanées de résistance à l'acridine. Dans ces conditions, des noyaux mutants porteurs de gènes de résistance préexisteraient dans le mycélium, avant tout contact avec l'acridine. De nouvelles mutations spontanées pourraient également se produire au cours de la croissance des hyphes, mais sans que l'acridine en soit responsable. Dans ce cas, l'acridine jouerait simplement le rôle d'un crible, éliminant tous les noyaux normaux, et permettant aux noyaux mutants de se diviser. La situation serait donc analogue à celle que l'on rencontre chez les bactéries pour les mutations spontanées de résistance aux antibiotiques ou aux bactériophages.

Une deuxième hypothèse peut être formulée : l'acridine serait douée d'une activité mutagène et serait directement responsable de la production des mutants à croissance lente.

Bien entendu, rien ne s'oppose — *a priori* — à ce que mutations spontanées et mutations induites de résistance à l'acridine coexistent.

On pourrait songer à étudier cette question par deux méthodes distinctes :

- A. — Essayer d'appliquer un procédé comparable au test de fluctuation de LURIA et DELBRÜCK.
- B. — Etablir si l'acridine est capable d'induire des mutants autres que ceux à croissance lente.

A. — Rappelons en quoi consiste le test de fluctuation de LURIA et DELBRÜCK. Considérons n tubes à essais contenant chacun le même nombre de bactéries en croissance. Si, à un moment donné, on introduit de la pénicilline dans chaque tube, les bactéries sensibles seront tuées et seuls survivront les mutants résistants. On peut aisément compter à ce moment le nombre de bactéries résistantes par tube. Dans ces conditions :

- 1) ou bien les bactéries résistantes préexistent avant tout contact avec la pénicilline et, dans ce cas, le nombre de bactéries mutantes par tube doit présenter des fluctuations considérables ($\sigma^2 \gg m$).
- 2) ou bien les mutations de résistance sont induites par la pénicilline elle-même et, dans ce cas, la distribution du nombre de bactéries mutantes par tube doit être conforme à la loi de Poisson ($\sigma^2 = m$).

On sait que la distribution effectivement observée est du type 1. La pénicilline se borne donc à trier les mutants préexistant dans les cultures.

Nous avons cherché à appliquer le test de LURIA et DELBRÜCK à l'étude de l'action de l'acridine sur *S. macrospora*. Nous avons opéré de la façon suivante : dans des boîtes de Pétri contenant du mycélium en voie de croissance active, on découpe — en périphérie — des carrés de gélose de taille égale. Ces carrés sont alors transférés sur un milieu contenant de l'acridine.

Si la concentration en cette dernière substance est suffisamment grande, la croissance du mycélium est rapidement bloquée. Il se développe ensuite éventuellement des colonies mutantes en divers points du fragment ensemencé.

Au bout de dix à quinze jours, on peut établir la distribution du nombre de colonies mutantes par carré ensemencé et la comparer à la distribution de POISSON. Malheureusement, nous n'avons pu, jusqu'ici, obtenir des résultats constants. Toutefois, dans une expérience, nous avons observé :

Nombre de colonies mutantes par carré	0	1	2	3 et plus
Observé	85	8	1	0
calculé (d. Poisson)	84,5	8,9	0,42	0,14

Mais ces chiffres sont insuffisants pour qu'on puisse affirmer, sans contestation possible, qu'il s'agit bien d'une loi de POISSON. Dans d'autres expériences, la variance a été supérieure à la moyenne, mais l'écart avec la loi de POISSON n'est cependant pas démesuré et ceci nous conduit à supposer que deux phénomènes ont lieu simultanément :

- 1) La production de mutations spontanées de résistance à l'acridine ;
- 2) L'induction de mutations de résistance par l'acridine elle-même.

B. — Nous avons aussi recherché si l'acridine était capable d'induire des mutants autres que ceux à croissance lente. Le procédé a simplement consisté à traiter du mycélium pendant des durées variables (de un à quatre jours), puis à le repiquer en milieu normal et à examiner les périthèces qui se formaient. Dans ces conditions, nous avons trouvé fréquemment des bouquets d'asques en disjonction renfermant des spores avortées. Ceci indique que l'acridine est susceptible de provoquer des cassures chromosomiques.

Par ailleurs, nous avons isolé un mutant à spores blanches, allèle de bl_1 , et un mutant à spores violettes, allèle de vi_1 . Enfin, nous avons observé un mutant à spores en désordre. Ce dernier est assurément distinct de ceux que nous avons obtenus sous l'action des rayons X, car il est caracté-

risé par le fait que ses ascospores sont incapables de germer. Pour cette raison, nous n'avons pu l'obtenir à l'état pur.

Au total, il n'est pas douteux que l'acridine possède une activité mutagène générale.

En conclusion, nous voyons que les mutants à croissance lente obtenus sous l'action de l'acridine sont des mutants de résistance à ce corps. Il semble probable qu'un grand nombre de ces mutants sont induits par l'acridine elle-même ; mais la possibilité de mutations spontanées n'est nullement exclue.

Enfin, il n'est pas possible de dire que l'acridine a une action mutagène dirigée. Elle possède au contraire une activité mutagène non spécifique. Cependant, dans certaines conditions expérimentales, l'acridine effectue un tri parmi les mutants qu'elle induit, et seuls subsistent ceux qui lui sont résistants.

V. BRYSON et W. SZYBALSKI (12) ont récemment passé en revue les travaux publiés sur la résistance des microorganismes à diverses substances toxiques. Ils considèrent comme peu vraisemblable la possibilité qu'une telle substance induise *spécifiquement* des mutations de résistance à elle-même. Nous venons de voir que l'action de l'acridine est effectivement non spécifique.

Notons enfin que les mutants à croissance lente ne sont obtenus sous l'action de l'acridine que si l'on a traité des hyphes en croissance. Cette nécessité peut s'expliquer par un retard de manifestation des mutations, exigeant une ou plusieurs mitoses avant de pouvoir s'exprimer.

Nous avons recherché si les mutants obtenus constituaient véritablement une classe spéciale de types résistants ou si, plus simplement, la croissance lente conférait, *ipso facto*, la résistance à l'acridine.

Pour cela, nous avons irradié le type sauvage de *S. macrospora* par les rayons X et nous avons isolé sept mutants distincts à croissance lente. Mis en présence d'acridine, en concentration toxique pour le mycélium sauvage, ces sept mutants meurent ; ils n'ont donc aucune résistance. Il en résulte que les mutants à croissance lente, obtenus sous l'action de l'acridine, constituent bien une classe particulière.

b) CARACTÈRES DES MUTANTS A CROISSANCE LENTE

Nous avons isolé vingt mutants à croissance lente qui ont été désignés par les symboles A - 1 à A - 20. Ces mutants ont les caractères suivants :

A - 1 : Croissance extrêmement lente. Hyphes très ramifiés, se chargeant d'un pigment noir intense. Ne fructifie pas.

A - 2 : Croissance très lente. Ne fructifie pas. Hyphes non pigmentés.

A - 3 : Croissance très lente. Hyphes produisant un pigment marron. Fructifie normalement.

A - 4 : Croissance lente. Formation d'un pigment marron. Fructifie.

A - 5 : Croissance très lente. Hyphes produisant un pigment marron clair. Montre des ébauches de périthèces, mais aucun asque ni ascospore ne sont formés.

A - 6 : Croissance très lente. Hyphes non pigmentés. Ne fructifie pas.

A - 7 : Croissance très lente. Hyphes non pigmentés. Ne fructifie pas.

A - 8 : Croissance lente. Hyphes produisant un pigment beige clair. Fructifie.

A - 9 : Croissance lente. Absence de pigment. Fructification normale.

A - 10 : Croissance lente. Production d'un pigment marron. Ebauches de périthèces n'évoluant pas jusqu'à la formation d'asques.

A - 11 : Croissance lente. Produit un pigment marron. Fructifie.

A - 12 : Croissance lente. Forme des périthèces ne renfermant pas d'asques.

A - 13 : Croissance lente. Absence de pigment. Fructification normale.

A - 14 : Croissance lente. Fructification normale.

A - 15 : Croissance très lente. Absence de pigment. Aucune fructification.

A - 16 : Croissance très lente et irrégulière. Formation d'un pigment marron. Ebauche de périthèces demeurant vides d'asques.

A - 17 : Croissance lente et irrégulière. Formation d'un pigment marron foncé. Ne fructifie pas.

A - 18 : Croissance lente. Fructifie.

A - 19 : Croissance lente et très irrégulière. Formation d'un pigment marron. Ebauches de périthèces n'évoluant pas jusqu'à la formation d'asques.

A - 20 : Croissance lente. Fructification normale.

Ces vingt mutants ont été soumis à une analyse génétique. En particulier, chacun d'eux a été croisé avec un mutant de couleur de spore (par exemple : bl₁). Les asques hybrides ont été disséqués et leurs huit spores repiquées. Dans tous les cas, les huit spores d'un asque donnent quatre cultures conformes au type sauvage en ce qui concerne la vitesse de croissance et quatre cultures à croissance lente identiques à la souche mutante étudiée. Ceci prouve donc que nous avons affaire à des mutations géniques. Cependant, en ce qui concerne les mutants A - 7 et A - 15, les asques hybrides contiennent toujours quatre spores qui germent en donnant des cultures de type sauvage, alors que les autres spores sont incapables de germer. La régularité de ségrégation indique que A - 7 et A - 15 sont des mutants géniques. L'absence de germination des spores est un effet des gènes en cause.

Pour préciser le nombre de loci, nous avons croisé chaque mutant avec les souches bl₁, j₁, j₂, r₁, r₂, vo₁, v₁, vo₂. La méthode utilisée et les résultats auxquels nous sommes ainsi parvenu seront exposés en détail ultérieu-

rement. Il nous suffit, pour le moment, d'indiquer que onze loci distincts ont été identifiés.

Par rapport à ces onze loci, les vingt mutants sont ainsi distribués :

- 1° A - 1, A - 18.
- 2° A - 2.
- 3° A - 3, A - 4, A - 6, A - 8, A - 11, A - 12, A - 13, A - 14, A - 20.
- 4° A - 5.
- 5° A - 7.
- 6° A - 9.
- 7° A - 10.
- 8° A - 15.
- 9° A - 16.
- 10° A - 17.
- 11° A - 19.

On constate immédiatement que le troisième locus a muté neuf fois, ce qui est considérable et semble indiquer soit une mutabilité particulière-ment élevée, soit une action semi-spécifique de l'acridine sur ce locus.

Nous avons déjà signalé les résultats obtenus par EPHRUSSI, SLONIMSKI et leurs collaborateurs (17, 50 à 56, 103, 154 à 156) chez *Saccharomyces cerevisiae*. Ils ont montré qu'un dérivé substitué de l'acridine, l'euflavine, est capable de transformer la levure normale en une forme à croissance lente, dépourvue de cytochrome-oxydase et de succino-déshydrogénase, c'est-à-dire que ce variant ne peut utiliser le glucose par voie respiratoire.

En ce qui concerne *S. macrospora*, la question se posait donc de savoir si les mutants à croissance lente, obtenus sous l'action de l'acridine, doivent leur caractère à une modification du système des cytochromes et, par conséquent, à une diminution de l'intensité respiratoire. Toutefois, nous savons qu'il s'agit ici de mutants géniques et non de mutation cytoplasmique, comme chez la levure.

La respiration de *S. macrospora* type et de trois des mutants précédents a été étudiée par la méthode manométrique de Warburg. Nous avons choisi les mutants A - 1, A - 2 et A - 19 dont la croissance est très lente.

Préalablement à ce test, nous avons cultivé le témoin et les mutants en milieu liquide agité, ayant la composition suivante :

5 gr autolysat de levure	} par litre.
30 gr glucose	

Le tout dans un tampon de phosphate M/15, réalisé par le mélange de $\text{Na}_2\text{H PO}_4$ et $\text{KH}_2\text{ PO}_4$.

Les trois pH suivants ont été essayés : 5,29 ; 6,47 ; 7,38. La croissance s'est révélée être la meilleure au pH = 5,29.

Le milieu a été placé en Erlenmeyers de 250 cm³, à raison de 25 cc par flacon. L'ensemencement a été réalisé et les cultures agitées constamment.

Au bout de quelques jours, le mycélium a proliféré de façon suffisante. Il est centrifugé et la consommation d'oxygène est mesurée au manomètre de Warburg, soit dans les conditions normales, soit en présence d'azide de sodium ($N_3 Na$).

Nous avons alors constaté que :

1°) Dans les conditions normales, la consommation d'oxygène est la même pour le témoin et les trois mutants.

2°) En présence d'azide de sodium, qui bloque la cytochrome-oxydase, la respiration est réduite d'environ 40 % par rapport au cas précédent, et ceci pour toutes les souches (témoins et mutants).

Il semble donc résulter de cette expérience que le système des cytochromes des mutants est normal. En effet, si ce système n'avait pas fonctionné, l'azide de sodium n'aurait pas entraîné une diminution de la respiration chez les mutants.

Nous avons abouti à une conclusion du même ordre par l'examen du spectre des cytochromes chez *S. macrospora* type et chez certains des mutants à croissance lente (en particulier A-1).

Le mycélium a été cultivé en milieu liquide agité. La culture a été ensuite centrifugée et le mycélium broyé avec une substance réductrice (hydrosulfite de sodium), le mélange a été placé dans une cellule d'ébonite, de 1 cm d'épaisseur, et examiné avec le spectroscope à réversion de Hartridge. L'éclairage a été assuré par une lampe de projection très puissante. Dans ces conditions, nous avons observé chez le témoin et les mutants les trois bandes suivantes (milieu des bandes) :

604 $m\mu$, 552 $m\mu$, 561 $m\mu$.

Il est donc clair que les mutants étudiés ont un système normal de cytochromes.

Enfin, une dernière confirmation nous a été donnée par la réaction de Nadi ; on sait qu'en présence d'oxygène la cytochrome-oxydase transforme le mélange d' α -naphthol et de diméthylparaphénylènediamine en bleu d'indophénol. Ce colorant précipite dans les cellules aux points où se trouve la cytochrome-oxydase.

Or, on constate que la réaction de Nadi est positive à la fois pour le mycélium sauvage et les mutants (extrémités en croissance). Les articles renferment un grand nombre de petites granulations bleues.

Un certain nombre d'auteurs ont présenté des objections relativement à la spécificité de la réaction de Nadi. C'est pourquoi, dans une contre épreuve, le mycélium a été préalablement traité par l'azide de sodium. Dans ce cas, la réaction de Nadi s'est montrée négative.

Au total, il nous semble légitime de conclure que les mutants obtenus sous l'action de l'acridine chez *S. macrospora* ont un système normal de cytochromes. Les modifications biochimiques responsables de leur croissance lente restent inconnues.

c) HÉTÉROCARYOTES ENTRE MUTANTS A CROISSANCE LENTE

Nous avons confronté deux à deux les mutants à croissance lente suivants : A-1, A-2, A-4, A-5, A-7, A-9, A-10, A-15, A-16, A-17, A-19, soit au total 55 combinaisons. De cette façon, les 11 loci distincts identifiés se trouvent représentés.

Dans la plupart de ces confrontations, et dans les 24 ou 48 heures qui suivent la mise en contact des hyphes des deux souches, un mycélium de type sauvage à croissance rapide se dégage du mélange et envahit rapidement toute la boîte de Pétri.

En utilisant la technique mise au point par RYAN, BEADLE et TATUM (142), nous nous sommes assuré que la vitesse de croissance de ce mycélium ne différerait pas de façon significative de celle du mycélium sauvage (soit 25 mm/24 heures à $t = 27-28^\circ$).

Cependant, dans un certain nombre de confrontations, aucun mycélium de type sauvage n'a jamais pu être obtenu, malgré le grand nombre d'essais que nous avons réalisés dans chaque cas. Les souches en cause peuvent être classées en deux groupes :

(1) A-4, A-5, A-7, A-15 ;

(2) A-9, A-10, A-7, A-15.

Ces deux groupes ont ainsi en commun les souches A-7 et A-15. Aucune des six confrontations possibles entre les souches du groupe (1) et des six possibles entre les souches du groupe (2) ne conduit à la formation d'un mycélium de type sauvage.

Par contre, les confrontations intergroupes : (A-4 $\times$ A-9), (A-4 $\times$ A-10), (A-5 $\times$ A-9), (A-5 $\times$ A-10), produisent un mycélium hétérocaryotique de type sauvage.

L'absence de mycélium de type sauvage dans les cas signalés plus haut montre bien qu'on ne peut utiliser ce critère avec sécurité pour déterminer si deux souches à croissance lente portent le même gène mutant. Ici, en effet, nous savons que toutes les souches confrontées portent des gènes distincts.

Des faits du même ordre ont été antérieurement mis en évidence par GARNJOBST (63) et HOLLOWAY (84) chez *Neurospora crassa*. Ces deux auteurs ont montré que certains gènes, différents de ceux qui sont responsables des déficiences biochimiques, peuvent empêcher la formation d'un hétérocaryote, ou modifier la stabilité et la vitesse de croissance de ce dernier.

En ce qui concerne les mutants à croissance lente induits par l'acridine chez *Sordaria macrospora*, la situation est différente. En effet, le mycélium sauvage que nous avons traité par l'acridine et qui a donné naissance aux mutants A-1, A-20, provient d'une souche reproduite en

autofécondation depuis un grand nombre de générations. On peut donc présumer que ce mycélium est génétiquement homogène. Dans ces conditions, il semble légitime de supposer que les souches A-1 ... A-20 ne diffèrent les unes des autres que par les loci que nous avons identifiés, responsables de la croissance lente.

Si nous considérons alors deux quelconques des mutants, soit A-7 et A-15, dont la confrontation ne donne pas de mycélium de type sauvage, il faut admettre que ce caractère est une propriété des loci A-7 et A-15 eux-mêmes et non de quelque autre gène.

L'absence de mycélium de type sauvage dans les confrontations mettant en jeu deux gènes non allèles peut avoir deux causes distinctes :

a) Il ne s'est pas formé de mycélium hétérocaryotique ;

b) Il s'est formé un mycélium hétérocaryotique, mais celui-ci est à croissance lente.

Dans le but de résoudre ce problème, nous avons réalisé en boîte de Pétri le mélange des deux souches A-4 et A-5 j_2 . Après quelques jours de croissance, on prélève en périphérie des extrémités d'hyphes. Chaque hyphe est repiqué séparément, puis croisé avec la souche bl_1 , et l'on étudie la descendance d'un tel croisement. Dans le cas où un hyphe aurait été hétérocaryotique, on devrait trouver des asques hybrides de deux sortes, à savoir $(+ \times bl_1)$ et $(j_2 \times bl_1)$ aisément identifiables par simple examen sous la loupe binoculaire.

Or, l'expérience a prouvé que les hyphes étudiés (cinquante) ne renfermaient jamais qu'un seul type de noyau : A-4 ou A-5 j_2 .

Nous sommes donc fondé à conclure que l'absence de mycélium de type sauvage dans le croisement A-4 $\times$ A-5 j_2 résulte de ce qu'il ne se forme pas de mycélium hétérocaryotique.

4. — ACTION DE L'EUFLAVINE

Si l'on incorpore de l'euflavine au milieu de culture (milieu de Dodge au moût de maïs) à la concentration de 1 pour 2.000, et que l'on y ensemence des hyphes de la souche sauvage, on constate que leur croissance est anormale ; ils sont moins denses et leur vitesse de développement, assez rapide au départ, diminue progressivement jusqu'à devenir nulle dans un laps de temps qui est de l'ordre de quarante-huit heures à 28°C.

Si, à ce moment, on prélève des hyphes dans la culture et qu'on les transfère en milieu normal sans euflavine, on n'observe aucune croissance : les hyphes sont morts.

Si, par contre, on effectue des prélèvements dans la culture au cours des premières vingt-quatre heures et qu'on les repique sur milieu normal, en tubes isolés, on constate que le mycélium pousse mais reste stérile. Toutes ces souches stériles ont une apparence identique.

En repiquant, en boîtes de Pétri, des hyphes issus de ces souches, on s'aperçoit que leur croissance est extrêmement irrégulière : alors que dans certains secteurs le développement se poursuit à faible vitesse, dans d'autres, les hyphes croissent en parcourant un tracé ondulant, puis s'arrêtent définitivement et meurent.

Aucune sélection, effectuée dans ces cultures d'aspect hétérogène, n'est jamais parvenue à en modifier le comportement.

Si les repiquages sont réalisés d'une façon très fréquente, la souche est rapidement perdue par mort des hyphes (suivant une phase de croissance ondulante).

Nous avons trouvé que la meilleure façon de conserver ces souches consistait à les repiquer aussi rarement que possible.

Ainsi, l'euflavine est susceptible d'induire chez *S. macrospora* une transformation qui semble irréversible, puisqu'en aucun cas les souches modifiées n'ont redonné des cultures normales fertiles.

On ne peut manquer d'être frappé par l'analogie qui existe entre les faits que nous venons de mentionner et ceux signalés par RIZET (136, 137), MARCOU (101, 102), RIZET et MARCOU (139), chez l'Ascomycète *Pleurage anserina*. Ces auteurs ont montré que, dans des conditions de croissance continue, les souches de cette espèce n'ont pas une longévité infinie. Au bout d'un certain temps, la vitesse de croissance diminue, puis l'allongement s'arrête et les extrémités des hyphes meurent. Dans la phase terminale de sa vie, le mycélium a une allure anormale et peut être considéré comme sénescant.

Les mêmes auteurs ont établi que des souches jeunes, conservées au frigidaire, ne vieillissent pas. De même, le vieillissement dépend de la température et du génotype. Enfin, des souches sénescantes peuvent être rajeunies par traitement au froid.

RIZET et MARCOU ont réalisé des croisements entre souches jeune et sénescante. *Pl. anserina* possède deux groupes de compatibilité (+) et (—), chaque souche (+) ou (—) étant autostérile tout en possédant des organes des deux sexes : oogones et microconidies. Il en résulte que chaque croisement peut être fait dans les deux sens : ♀ (+) × ♂ (—) ou ♀ (—) × ♂ (+).

Or, dans le croisement ♀ sénescante × ♂ jeune, une fraction des périthèces fournit une F₁ sénescante dès le début. L'absence de ségrégation semble indiquer que la sénescence résulte d'une modification du cytoplasme.

Le caractère homothallique de *S. macrospora* ne permet pas de réaliser les deux croisements réciproques entre une souche normale et une souche stérile obtenue par action de l'euflavine. Cependant, il est très facile de réaliser le croisement et d'étudier le comportement héréditaire du caractère de stérilité. Il suffit de confronter une souche stérile avec une souche

normale à spores blanches (bl_1). Dans ces conditions, on obtient des asques hybrides, aisément identifiables, renfermant quatre spores blanches et quatre spores noires.

Nous avons repiqué séparément les spores extraites d'un grand nombre de ces asques. Nous n'avons obtenu que des cultures parfaitement fertiles. Il semble donc légitime de conclure que la transformation induite par l'euflavine est de nature cytoplasmique. Il peut s'agir de la perte d'un certain type de mitochondrie.

Ceci permettrait d'expliquer les précédents résultats. En effet, au moment de la confrontation entre une souche normale et une souche stérile, des anastomoses entre hyphes ont lieu, ce qui se traduit par une mise en commun des cytoplasmes ; le cytoplasme déficient peut ainsi recevoir les éléments qui lui manquent.

On doit d'ailleurs noter que dans cette hybridation entre une souche fertile et une souche stérile, on rencontre trois types de bouquets dont les asques renferment respectivement soit quatre spores blanches et quatre spores noires (hybride), soit huit spores blanches, soit huit spores noires. Les spores extraites de ce dernier type d'asque donnent naissance à des cultures parfaitement fertiles et indistinguables du type sauvage.

Ainsi donc, sans qu'il y ait eu d'hybridation, le type à spores noires a retrouvé une parfaite fertilité. C'est une preuve supplémentaire du déterminisme cytoplasmique de la stérilité induite par l'euflavine.

Il est d'ailleurs facile de prouver que les noyaux de la souche bl_1 n'interviennent pas. Pour cela, nous avons soumis un carré de gélose contenant des hyphes bl_1 à une très forte irradiation par les rayons X (200.000 roentgens). Avec une telle dose, nous sommes certain que tous les noyaux sont détruits. De fait, si l'on repique le carré de gélose irradié en milieu normal, on constate que quelques hyphes poussent, mais ils ont un aspect très aberrant et ils cessent leur croissance et meurent après avoir parcouru un ou deux millimètres.

Cependant, si nous confrontons dans une boîte de Pétri des hyphes bl_1 ainsi irradiés avec des hyphes d'une souche stérile (induite par l'euflavine), on s'aperçoit qu'après une période de latence de vingt-quatre à quarante-huit heures, des hyphes à croissance rapide s'échappent du mélange et envahissent rapidement toute la boîte. Il se forme en périphérie de nombreux périthèces. On constate alors que les asques qu'ils contiennent ont tous huit spores noires. Il n'y a pas de trace d'asques hybrides, ni d'asques à huit spores blanches. Ceci est normal, puisque les noyaux bl_1 ont été détruits par l'irradiation.

Si l'on repique isolément les ascospores noires formées (132 repiquées), on obtient des cultures fertiles, identiques en tous points à la souche sauvage.

Ces faits s'interprètent en supposant que le mycélium à croissance rapide, issu de la confrontation, ne renferme que des noyaux de type sauvage, et a pour cytoplasme celui de la souche stérile rendu normal par apport d'éléments (mitochondries ?) venant de la souche bl_1 .

CHAPITRE V

CONSTRUCTION DE LA CARTE GENIQUE

Nous avons exposé dans le Chapitre III comment les tests d'allélisme permettent d'analyser les mutations géniques et d'établir le nombre de loci en cause.

Nous allons maintenant montrer qu'on peut, par l'étude statistique des différentes sortes d'asques, fixer la position des gènes par rapport à leurs centromères respectifs.

Enfin, considérant les gènes deux à deux, dans le cadre d'un système de référence, nous préciserons s'ils se trouvent ou non sur le même chromosome. Etant donné qu'il y a sept chromosomes chez *S. macrospora*, on peut s'attendre à trouver sept groupes de liaison.

1. — CONSIDERATIONS GENERALES

Considérons la souche bl_1 ; confrontons-la, en boîte de Pétri, avec la souche sauvage. Il se forme en périphérie de nombreux périthèces dont certains au moins renferment des asques hybrides montrant la ségrégation (quatre spores noires, quatre spores blanches). On constate que ces asques peuvent se ranger en six catégories bien distinctes que nous désignerons par I, II, III, IV, V, VI (tableaux 18, 19 et pl. 31, 32). Pour peu qu'on ait compté un nombre d'asques suffisant, il est facile de voir que les fréquences des classes I et II sont égales. De même, les classes III, IV, V, VI, sont également représentées.

En outre, à une température fixe, la fréquence globale des classes (III + IV + V + VI) est constante.

Des faits identiques sont connus depuis longtemps chez l'ascomycète *Neurospora*. Ils ont été interprétés par une série d'auteurs, parmi lesquels nous citerons LINDEGREN (91 à 94), LINDEGREN et LINDEGREN (96, 97), DODGE (42), RYAN (141).

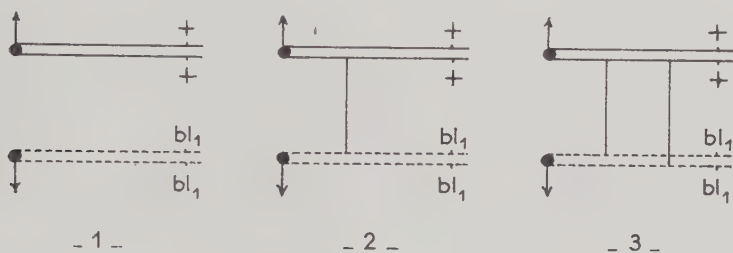
Dans le cas présent, considérons le chromosome porteur du gène bl_1 . Représentons-le par un trait sur lequel nous plaçons le locus bl_1 et le centromère, point d'attache sur le fuseau et organe moteur du chromosome.

Soit alors un jeune asque hybride dont le noyau diploïde est hétérozygote et possède sur un chromosome le locus (bl_1) et sur le chromosome homologue l'allèle sauvage (+).

En prophase de la méiose, ces chromosomes s'apparient, puis chacun d'eux se clive et des échanges (crossing-over) peuvent avoir lieu entre chromatides non homologues.

Plusieurs cas sont possibles :

1. Il ne s'est pas produit de crossing-over entre le centromère et le locus bl_1 ;
2. Il s'est produit un crossing-over dans cette zone ;
3. Il s'est produit deux crossing-over ;
4. Il s'est produit plus de deux crossing-over.



Envisageons quelles sont les conséquences de ces diverses éventualités :

(1) *Pas de crossing-over* : Dans ce cas, en anaphase I, les deux centromères s'éloignent l'un de l'autre en direction des pôles ; l'un entraîne deux chromatides (+) et l'autre deux chromatides (bl_1).

En anaphase II, les centromères se clivent et les chromosomes se séparent. Etant donné qu'il n'y a pas empiètement des fuseaux à ce stade, fait que nous avons établi au cours de notre étude cytologique de *S. macrospora*, on voit qu'en télophase II la moitié supérieure de l'asque renferme deux noyaux (+) et la moitié inférieure deux noyaux (bl_1) (bien entendu, la disposition inverse a tout autant de chances de se réaliser).

La troisième division est une simple mitose et nous savons qu'il n'y a pas empiètement des quatre fuseaux. En conséquence, l'asque renferme en télophase III quatre noyaux (+) dans sa moitié supérieure et quatre noyaux (bl_1) dans sa moitié inférieure (ou l'inverse).

Ainsi, en l'absence de crossing-over dans l'intervalle entre le centromère et le locus (bl_1), on obtient les deux classes d'asques I et II avec une égale probabilité.

Les deux noyaux de télophase I étant homozygotes $+/+$ et bl_1/bl_1 , on dit que la ségrégation a eu lieu en première division (pré-réduction).

(2) *Un crossing-over* a eu lieu dans l'intervalle considéré ; en ana-

TABLEAU 18 - SEGREGATION DES GENES
COMMANDANT LA COULEUR DE
L'ASCOSPORE -

$t = 21^{\circ}\text{C}$

							% DE POST- REDUCTION	% DE RECOMBIN. AVEC LE CENTROMERE
$+ \times bl_1$	265	223	67	67	67	71	$35,6 \pm 1,7$	$17,8 \pm 0,8$
$+ \times j_1$	174	169	72	62	61	68	43 ± 2	$21,5 \pm 1$
$+ \times j_2$	190	183	65	63	78	62	$41,8 \pm 1,9$	$20,9 \pm 0,9$
$+ \times r_1$	210	203	114	130	111	119	$53 \pm 1,7$	$26,5 \pm 0,8$
$+ \times r_2$	533	520	-	-	-	-	0	0
$+ \times vo_1$	207	172	176	164	164	161	$63,6 \pm 1,5$	$31,8 \pm 0,7$
$+ \times vo_2$	161	131	156	141	135	145	$66,2 \pm 1,6$	$33,1 \pm 0,8$
$+ \times v_1$	122	105	162	175	170	144	$74,1 \pm 1,5$	$37,05 \pm 0,7$

TABLEAU 19 - SEGREGATION DES GENES
COMMANDANT LA COULEUR DE
L'ASCOSPORE -

$t = 27^{\circ}\text{C}$

							% DE POST- REDUCTION	% DE RECOMBIN. AVEC LE CENTROMERE
$+ \times bl_1$	753	693	300	258	264	242	$42,4 \pm 1$	$21,2 \pm 0,5$
$+ \times j_1$	545	514	300	263	245	236	$49,6 \pm 1,1$	$24,8 \pm 0,5$
$+ \times j_2$	145	135	75	85	49	46	$47,6 \pm 2,1$	$23,8 \pm 1$
$+ \times r_1$	148	149	122	116	95	113	$60 \pm 1,8$	$30 \pm 0,9$
$+ \times r_2$	1443	1336	6	8	1	4	$0,67 \pm 0,15$	$0,33 \pm 0,07$
$+ \times vo_1$	152	140	123	125	128	132	$63,5 \pm 1,7$	$31,7 \pm 0,8$
$+ \times vo_2$	149	143	128	132	143	114	$63,9 \pm 1,7$	$31,9 \pm 0,8$
$+ \times v_1$	137	116	141	126	119	120	$66,6 \pm 1,7$	$33,3 \pm 0,8$

phase I, chaque centromère entraîne deux chromatides dont l'une porte le gène (+) et l'autre le gène (bl_1). Il en résulte que les deux noyaux de télophase I sont hétérozygotes (+/ bl_1).

En anaphase II, il y a clivage des centromères et séparation des chromatides. En télophase II, quatre dispositions distinctes des noyaux sont possibles et également probables.

La troisième division, qui est une simple mitose, ne modifie pas ces dispositions. On obtient donc en définitive les quatre classes d'asques III, IV, V et VI.

Les noyaux de télophase I étant hétérozygotes +/ bl_1 et la séparation des allèles (+) et (bl_1) ne se produisant qu'en anaphase II, on dit que la ségrégation a lieu en deuxième division (post-réduction).

(3) Deux *crossing-over* se sont produits dans l'intervalle considéré. En l'absence d'interférence chromatidique, il y a seize dispositions également probables qu'on peut classer en trois catégories, suivant le nombre de chromatides affectées :

2 chromatides affectées : 1/4 (Pré-réduction) ;

3 chromatides affectées : 1/2 (Post-réduction) ;

4 chromatides affectées : 1/4 (Pré-réduction).

Ainsi, au total, un double *crossing-over* a des chances égales de conduire à une pré- ou une post-réduction.

(4) Si l'intervalle séparant le gène du centromère est très long, il est théoriquement possible qu'il se produise trois, quatre... *crossing-over*. Ils conduiront, suivant les cas, à une pré- ou une post-réduction.

Au total, nous voyons donc que :

Pas de <i>crossing-over</i>	: Pré-réduction.
Un <i>crossing-over</i>	: Post-réduction.
Deux <i>crossing-over</i>	: Pré- et post-réduction.
Trois <i>crossing-over</i> et plus	: Pré- et post-réduction.

Si l'intervalle est suffisamment court pour qu'il ne s'y produise jamais plus d'un *crossing-over*, on peut calculer le pourcentage de recombinaison entre le gène et son centromère. La recombinaison exige qu'il y ait un *crossing-over*, mais étant donné que celui-ci n'affecte que deux chromatides sur quatre (50 %), il est clair que nous avons la relation :

$$\% \text{ de recombinaison} = \frac{1}{2} (\% \text{ de post-réduction}).$$

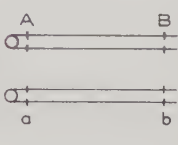
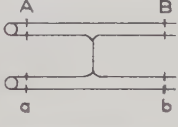
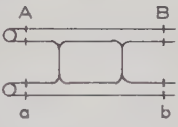
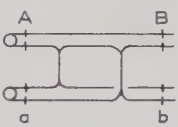
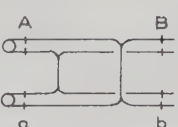
Ceci nous donne une mesure de la distance du gène au centromère.

Cependant, si le gène est plus éloigné, des *crossing-over* multiples pourront avoir lieu. Dans ce cas, l'expression précédente ne donnera plus qu'une valeur approximative — voire totalement fausse — du pourcentage de recombinaison (lequel reste fixé à 50 % dès que le nombre moyen de chiasma dans l'intervalle considéré est égal ou supérieur à un).

En effet, MATHER a montré que le pourcentage de post-réduction est, avec n crossing-over, de :

$$66,7 \left[1 - \left(-\frac{1}{2} \right)^n \right]$$

Ce qui donne avec 0, 1, 2, 3, 4... ∞ chiasma les pourcentages de post-réduction respectifs de 0, 100, 50, 75, 62,5..... 66,7.

PAS DE CROSSING-OVER			ASQUE DE TYPE 1 (PAS DE RECOMBIN.)	1 ^e DIVISION POUR A 1 ^e DIVISION POUR B
CROSSING-OVER SIMPLE			ASQUE DE TYPE 2 (RECOMBIN.)	1 ^e DIVISION POUR A 2 ^e DIVISION POUR B
CROSSING-OVER DOUBLE (2 CHROMATIDES INTERESSEES)			ASQUE DE TYPE 1 (PAS DE RECOMBIN.)	1 ^e DIVISION POUR A 1 ^e DIVISION POUR B
CROSSING-OVER DOUBLE (3 CHROMATIDES INTERESSEES)			ASQUE DE TYPE 2 (RECOMBIN.)	1 ^e DIVISION POUR A 2 ^e DIVISION POUR B
CROSSING-OVER DOUBLE (4 CHROMATIDES INTERESSEES)			ASQUE DE TYPE 3 (RECOMBIN.)	1 ^e DIVISION POUR A 1 ^e DIVISION POUR B

D'une façon générale, dans l'analyse des tétrades de *Neurospora* ou de *Sordaria*, il y a lieu de bien distinguer deux types d'intervalles :

1) L'intervalle limité par un gène et un centromère. Ici, comme nous

venons de le voir, le pourcentage de post-réduction donne une mesure approximative du pourcentage de recombinaison (c'est ce qu'on appelle

la distance au centromère = $\frac{1}{2}$ [% post-réduction]).

2) L'intervalle limité par deux gènes : dans ce cas, la distance est généralement mesurée par le pourcentage de recombinaison.

Or, il est facile de voir que ces deux mesures de distance ne sont pas équivalentes. Il suffit d'examiner le tableau page 123 qui illustre le cas de la méiose chez un hétérozygote AB/ab.

Trois types d'asques sont possibles :

- (1) pas de recombinaison ;
- (2) recombinaison (50 %) ;
- (3) recombinaison (100 %).

On constate que les crossing-over doubles intéressant quatre chromatides sont détectés (recombinaison) lorsque les limites de l'intervalle sont marquées par des gènes (asque de type 3). Par contre, si l'intervalle est limité par un gène et un centromère, ce type de crossing-over double n'est pas détecté (le gène ségrège en 1^{re} division).

Par conséquent, la ségrégation en 1^{re} division pour un intervalle gène-centromère est équivalente à la somme des types d'asques (1) + (3) pour un intervalle gène-gène. Inversement, la ségrégation en 2^e division équivaut au type (2). Cette équivalence est également valable pour les crossing-over d'ordre supérieur.

Pour la construction des cartes géniques, il suffit donc d'utiliser comme mesure des liaisons le pourcentage d'asques de type (2) ou le pourcentage de post-réduction, suivant le type d'intervalle considéré.

Les cartes construites à partir de ces données brutes ne sont pas corrigées pour l'existence de crossing-over multiples, c'est-à-dire qu'elles supposent que l'interférence entre chiasma est complète. Cependant, une correction peut être appliquée aux deux types d'intervalles.

CORRECTION DES DISTANCES

Chez *Neurospora*, la plupart des intervalles étudiés sont suffisamment longs pour qu'il s'y produise des crossing-over multiples. Nous verrons bientôt que c'est également le cas de *Sordaria macrospora*.

Une méthode permettant de corriger les erreurs dues aux crossing-over multiples non détectés comme tels s'est donc rapidement avérée nécessaire.

D'une façon très générale, le pourcentage de recombinaison y entre deux loci peut être utilisé comme mesure de distance, à condition que les

gènes ne soient pas trop éloignés. Pour des gènes plus éloignés, il y a lieu d'introduire une distance corrigée x (map distance), qui est définie comme le nombre moyen de points d'échange par chromatide ($\times 100$), à l'intérieur du segment considéré.

En général, x et y ne sont pas égaux et ce pour deux raisons : l'existence de crossing-over multiples et le phénomène d'interférence entre chiasma.

HALDANE a montré qu'en l'absence d'interférence on a la relation :

$$y = \frac{1}{2} (1 - e^{-2x})$$

Ultérieurement, KOSAMBI a proposé la formule :

$$y = \frac{1}{2} \tanh 2x$$

qui tient compte à la fois des crossing-over multiples et d'une interférence moyenne. Cependant, la formule de KOSAMBI reste peu satisfaisante à divers points de vue.

En particulier, pour *Neurospora* et *Sordaria*, les seules données expérimentales communes à tous les types d'intervalles sont le pourcentage de post-réduction et le pourcentage d'asques de type (2). Il importait donc de trouver une expression permettant de calculer x à partir de ces données.

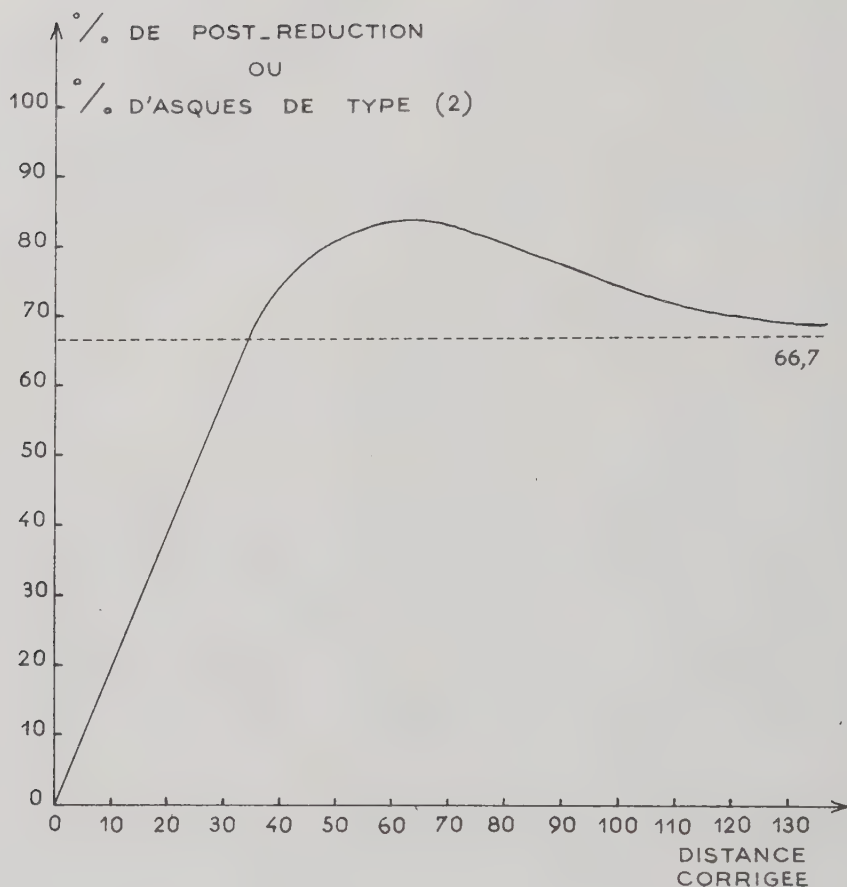
R. W. BARRATT, D. NEWMAYER, D. D. PERKINS et L. GARNJOBST (5) ont proposé une fonction à cet effet. Celle-ci tient compte d'une interférence positive entre chiasma, et le coefficient correspondant ($K = 0,2$) a été choisi de telle façon que les prévisions soient en bon accord avec les faits connus chez *Drosophila* et *Neurospora*.

Après avoir examiné les hypothèses faites par les auteurs précédents, il nous apparaît que leur fonction devrait pouvoir s'appliquer également au cas du *Sordaria*. Bien entendu, ceci demeure une simple hypothèse de travail, tant qu'une expérimentation détaillée n'a pas été conduite sur ce point.

A partir du pourcentage de post-réduction (ou du pourcentage d'asques de type 2), cette fonction permet de calculer x , longueur corrigée (= Map distance) du segment considéré. Les auteurs ont présenté leur fonction sous forme graphique (voir fig. p. 126).

On constate l'existence d'un pourcentage maximum (environ 83,5 %) de post-réduction, correspondant à une distance corrigée de 65 unités. Au-delà, le pourcentage baisse et tend asymptotiquement vers 66,7 %.

On notera que pour les gènes présentant un pourcentage de post-réduction de 66,7, la distance corrigée x est indéterminée et peut avoir deux valeurs distinctes. Enfin, au voisinage immédiat de 66,7, la valeur x reste totalement imprécise.



2. — DISTANCE DES GENES AU CENTROMERE

a) GÈNES COMMANDANT LA COULEUR DE L'ASCOSPORE

Chacune des souches bl_1 , j_1 , j_2 , r_1 , r_2 , vo_1 , vo_2 , v_1 , a été croisée avec la souche sauvage et les six types d'asques ont été dénombrés.

Les cultures ont été conduites à plusieurs températures, à savoir : 3° ; 9° ; $12^\circ,5$; $17^\circ,5$; 21° ; 27° . Les résultats figurent dans les tableaux 18, 19, 20 et 21.

Il importe, en premier lieu, de rechercher si, dans chaque cas, il y a bien égalité des types I et II d'une part, III, IV, V et VI d'autre part. Ce test se fait en utilisant le critérium χ_i . Sans qu'il semble utile de rapporter ici

le détail des calculs, nous pouvons dire qu'il n'y a qu'un seul cas discordant, à propos du croisement $(+) \times (r_2)$. Ici, les classes I et II ne sont pas égales ($\chi^2_{(1)} = 4,12$ soit : $0,01 < P < 0,05$).

Cependant, dans l'ensemble, les résultats confirment pleinement l'égalité des classes I et II et celle des classes III, IV, V et VI. Il ne semble pas en être toujours de même. Ainsi, CATCHESIDE (14, 15), WHITEHOUSE et HALDANE (169) analysant les résultats obtenus par ZICKLER (173 à 175) pour les mutants de couleur d'ascospore lactea et rubiginosa, chez *Bombardia lunata*, ont établi que les classes I et II d'une part, III, IV, V et VI de l'autre, sont inégales.

Nous avons vu précédemment que la courbe théorique de BARRATT, NEWMYER, PERKINS et GARNJOBST prévoit l'existence de pourcentages de post-réduction supérieurs à la limite théorique de 66,7 %. Nous voyons que c'est ici le cas pour les gènes v_1 , vo_1 et vo_2 , au moins à certaines températures. Nous verrons ultérieurement que des pourcentages supérieurs à 66,7 % ont été obtenus pour plusieurs autres loci.

Il est intéressant de noter que des pourcentages de post-réduction supérieurs à 2/3 n'ont pas encore été rencontrés chez *Neurospora*. De même OLIVE (117), étudiant les pourcentages de post-réduction de trois gènes de *S. fimicola* en fonction de la température, n'a pas observé de valeurs supérieures à 66,7 %.

BISTIS (9) n'en a pas davantage trouvé chez *Ascobolus stercorarius*.

Par contre, chez *Pleurage anserina*, RIZET et ENGELMANN (138) en ont signalé.

La comparaison des tableaux 18, 19, 20 et 21 montre que la température a une action très marquée sur le pourcentage de post-réduction. Les courbes de variation nous paraissent très difficiles à interpréter.

Chez *Drosophila* (124, 125), PLOUGH avait déjà trouvé une loi de variation complexe pour les pourcentages de recombinaison des gènes b, pr, c en fonction de la température : il existe un minimum à 9°, un premier maximum à 13°, un deuxième minimum vers 24°, puis un second maximum à 31°. Dans le troisième chromosome, PLOUGH a trouvé qu'une région est sensible et le reste insensible aux effets de la température.

WHITE (165) a étudié cytologiquement trois insectes différents à des températures variées. Il a compté le nombre de chiasma par bivalent en diacinèse. Chez *Stenobothrus parallelus*, observé à 2°, 10°, 23° et 37° C, il a trouvé que le nombre moyen de chiasma passe par un maximum à 10° et 37°.

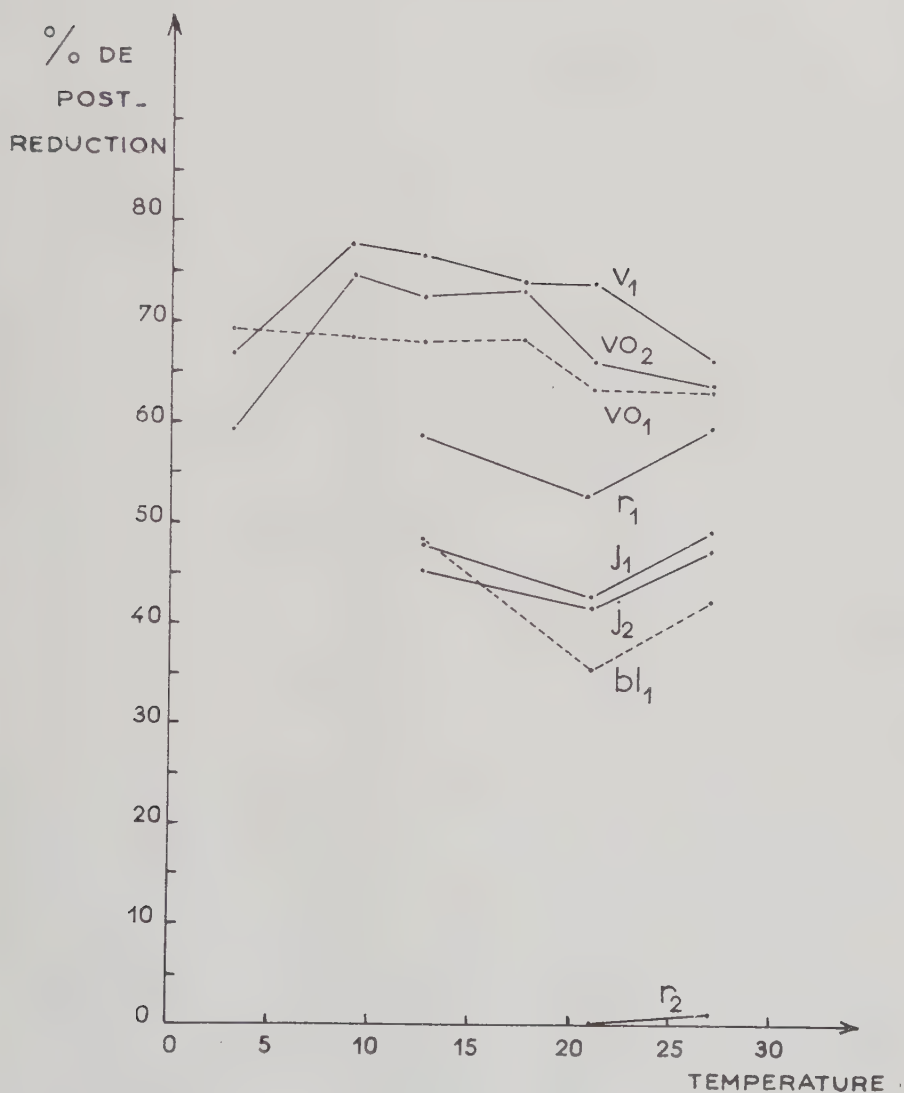
Chez *Sordaria fimicola* (117), OLIVE a étudié la variation du pourcentage de post-réduction pour les trois gènes g, hy et y en fonction de la température (7°, 13°, 23°, 31°). Suivant les cas, une augmentation de température peut entraîner un accroissement ou une diminution du pourcentage de post-réduction.

TABLEAU 20_

GENES COMMANDANT LA COULEUR DE L'ASCOSPORE -
VARIATION DU POURCENTAGE DE POST-REDUCTION
AVEC LA TEMPERATURE (SUITE)

TEMPE- -RATURE CROISEMENT	3°			9°			12°5			17°5		
	1 ^{er} DIV.	2 ^{es} DIV.	% POST- REDUCTION	1 ^{er} DIV.	2 ^{es} DIV.	% POST- REDUCTION	1 ^{er} DIV.	2 ^{es} DIV.	% POST- REDUCTION	1 ^{er} DIV.	2 ^{es} DIV.	% POST- REDUCTION
+ x bl ₁							470	442	48,5 ± 1,6			
+ x j ₁							458	426	48,2 ± 1,7			
+ x j ₂							626	521	45,4 ± 1,5			
+ x r ₁							1056	1526	59,1 ± 1			
+ x VO ₁	244	480	69,3 ± 1,7	120	265	68,8 ± 2,4	118	247	67,7 ± 2,4	252	545	68,4 ± 1,6
+ x VO ₂	302	440	59,3 ± 1,8	203	602	74,8 ± 1,5	89	236	72,6 ± 2,5	162	448	73,4 ± 1,8
+ x V ₁	202	408	66,9 ± 1,9	219	782	78,1 ± 1,3	170	563	76,8 ± 1,5	124	356	74,2 ± 2

TABLEAU 21_GENES COMMANDANT LA
COULEUR DE L'ASCOSPORE_VARIATION
DU POURCENTAGE DE POST-REDUCTION
AVEC LA TEMPERATURE



Des faits du même ordre ont été observés par BISTIS (9) chez *Ascobolus stercorarius*.

Au total, on voit que l'action de la température est complexe. Aucune explication cohérente des faits observés n'a été proposée jusqu'ici.

Pour la construction de la carte génique, ce sont les valeurs obtenues à 21° C qui ont été retenues. Le tableau 18 indique les distances non corrigées. A partir du graphique de BARRATT et al., on obtient les distances corrigées suivantes :

Gène	Distance corrigée	Gène	Distance corrigée
bl ₁	19 (17,2-21)	r ₂	0
j ₁	23,3 (21 -25,7)	vo ₁	37,2 (35-39,8)
j ₂	22,6 (20,3-24,7)	vo ₂	39,3 (37-42,2)
r ₁	29,6 (26,2-32)	v ₁	47 (44-50,2)

Les chiffres indiqués entre parenthèses représentent les limites supérieure et inférieure au seuil 5 %.

Rappelons qu'il existe une ambiguïté pour les gènes présentant un pourcentage de post-réduction égal ou supérieur à 66,7 %. C'est le cas de vo₁, vo₂ et v₁. Pour ces gènes, la distance corrigée peut être l'une des deux valeurs correspondant soit à la première branche, soit à la deuxième branche de la courbe, de part et d'autre du maximum. Cette seconde valeur reste très imprécise en raison même de la forme asymptotique de la courbe. Dans le tableau précédent, nous avons arbitrairement choisi la première valeur.

Pour les cinq autres gènes (bl₁, j₁, j₂, r₁, r₂), il n'y a, par contre, aucune ambiguïté. La courbe de BARRATT et al. conduit à une valeur unique pour la distance corrigée.

b) AUTRES GÈNES

Nous avons évalué les pourcentages de post-réduction pour un certain nombre d'autres gènes. Le procédé consiste à croiser chaque souche avec un mutant autonome de couleur d'ascospore. Les asques hybrides sont alors disséqués un à un et leurs ascospores repiquées. On peut ainsi déterminer si la ségrégation a eu lieu en première ou en deuxième division.

Le travail peut être diminué de façon appréciable si l'on remarque qu'il suffit d'étudier le contenu d'un demi-asque (supérieur ou inférieur) pour établir le mode de ségrégation. Par ailleurs, les spores-sœurs étant génétiquement identiques, on peut les repiquer ensemble. En réalité, des empiètements de fuseaux ont lieu occasionnellement (Pl. 32, fig. 3, 4), mais c'est là un événement rare qu'on peut négliger.

TABLEAU 22 _

POURCENTAGES DE SEGREGATION EN DEUXIEME
DIVISION POUR QUELQUES GENES

I = 21 _ 23°C

LOCUS	ASQUES SEGREGANT EN		% DE POST-REDUCTION	% DE RECOMBIN. AVEC LE CENTROMERE
	1 ^e DIV.	2 ^e DIV.		
ds ₁	66	94	58,7 ± 3,9	29,3 ± 1,9
ds ₂	90	167	64,9 ± 3	32,4 ± 1,5
ds ₃	57	184	76,3 ± 2,7	38,1 ± 1,3
ir ₁	99	219	68,8 ± 2,6	34,4 ± 1,3
sps ₁	108	170	61,1 ± 2,9	30,5 ± 1,4
A_1	738	7	0,9 ± 0,3	0,4 ± 0,1
A_2	148	254	63,1 ± 2,4	31,5 ± 1,2
A_4	259	701	73,0 ± 1,4	36,5 ± 0,7
A_5	149	406	73,1 ± 1,9	36,5 ± 0,9
A_7	111	283	71,8 ± 2,3	35,9 ± 1,1
A_9	169	308	64,4 ± 2,2	32,2 ± 1,1
A_10	282	403	58,8 ± 1,9	29,4 ± 0,9
A_15	344	94	21,4 ± 1,9	10,7 ± 0,9
A_16	195	443	69,4 ± 1,8	34,7 ± 0,9
A_17	84	202	70,6 ± 2,7	35,3 ± 1,3
A_19	238	1	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,1

Au total donc, les asques hybrides sont prélevés au hasard et, dans chaque asque, on repique par groupe de deux les quatre spores supérieures ou inférieures. Il y a donc deux tubes de culture par asque. On les réunit par un bracelet de caoutchouc et, au moment de la fructification, on les classe en trois groupes, soit (en prenant le mutant ds_1 comme exemple) :

$$(ds_1) - (ds_1) ; (+) - (+) ; (+) - (ds_1)$$

Les deux premiers correspondant évidemment à une ségrégation en première division et le dernier à une post-réduction.

Le tableau 22 indique les résultats auxquels nous sommes parvenu pour les seize loci étudiés. On ne s'étonnera pas de constater que ces mutants sont, pour la plupart, des formes à croissance lente, induites par l'acridine. En effet, l'étude de la ségrégation est ici à la fois plus facile et plus rapide car une culture peut être classée dès la germination de l'ascospore. Il est donc inutile de repiquer en tubes les ascospores issues d'asques hybrides. Il suffit de les ensemercer dans des boîtes de Pétri. Chaque boîte (diam. = 10 cm) est divisée en seize cases par un quadrillage réalisé sur le fond à l'aide d'un crayon noir gras, ce qui permet de déterminer le mode de ségrégation pour huit asques.

Il est à noter que les chiffres donnés pour le locus A - 1 comportent également ceux concernant A - 18, qui est allèle du précédent.

De même, les chiffres indiqués pour A - 4 sont, en fait, la somme de ceux obtenus avec les autres allèles, à savoir : A - 3, A - 6, A - 8, A - 11, A - 12, A - 13, A - 14, A - 20.

On remarque que le pourcentage de post-réduction est significativement supérieur à 66,7 pour les loci ds_3 , A - 4, A - 5 et A - 7.

A partir du graphique de BARRATT et al., on obtient les distances corrigées suivantes :

Gène	Distance corrigée	Gène	Distance corrigée
ds_1	33,6 (28,2-39,6)	A - 5	45,8 (42 -50)
ds_2	38,2 (33,8-43,7)	A - 7	44,5 (40,2-49,4)
ds_3	49,3 (43,7-57,5)	A - 9	38 (34,5-41,8)
ir_1	41,7 (37,3-47)	A - 10	33,7 (31 -36,5)
sps_1	35,5 (31,2-39,9)	A - 15	11,3 (9,3 13,2)
A - 1	0,5 (0,2- 0,8)	A - 16	42,2 (39 -45,8)
A - 2	37,0 (33,3-40,8)	A - 17	43,4 (38,7-49)
A - 3	45,7 (43 -48,8)	A - 19	0,2 (0 - 0,5)

Les chiffres indiqués entre parenthèses représentent les limites supérieures et inférieures au seuil 5 %.

Comme précédemment, pour les gènes présentant un pourcentage de post-réduction $\geq 66,7$, seule la distance corrigée la plus faible a été indiquée.

3. — RAPPORTS MUTUELS DES GENES

Il importe maintenant de préciser la répartition des gènes sur les sept chromosomes de *S. macrospora*. Dans cette entreprise, les mutants de couleur d'ascospores vont jouer un rôle capital en nous fournissant un système de référence. En effet, leur manifestation autonome permet d'identifier immédiatement les asques hybrides, tâche essentielle puisqu'il s'agit d'un organisme homothallique, capable de s'autoféconder.

Il est donc nécessaire de confronter deux à deux les mutants appartenant à ce groupe et d'établir ainsi s'ils sont indépendants ou liés.

a) LE SYSTÈME DE RÉFÉRENCE

Les huit mutants $bl_1, j_1, j_2, r_1, r_2, vo_1, vo_2, v_1$ peuvent être croisés deux à deux de vingt-huit façons possibles. Cependant, avant d'exposer les résultats que nous avons obtenus, il est utile d'étudier théoriquement le cas de deux gènes indépendants, gouvernant la couleur de l'ascospore, soient a et b (allèles sauvages correspondants : A et B). Les spores peuvent appartenir à quatre génotypes distincts :

$$Ab; aB; AB; ab$$

que nous supposons phénotypiquement reconnaissables (voir tableau 23).

En simplifiant, quatre cas sont à envisager :

1. — Il ne s'est produit aucun crossing-over dans les deux intervalles séparant chaque centromère des gènes considérés : on obtient alors les types d'asques A et B avec une égale probabilité.

2. — Il s'est produit un crossing-over simple entre A et son centromère, mais aucun n'a eu lieu entre B et son centromère : on obtient les quatre types d'asques C, D, E, F avec une égale fréquence.

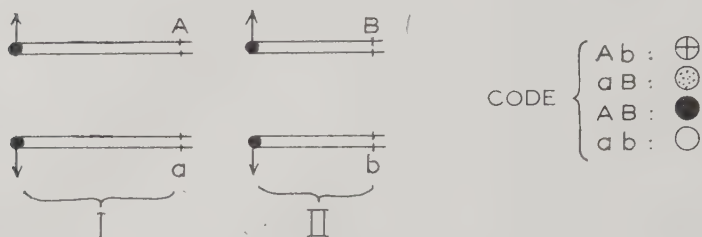
3. — C'est la situation inverse de la précédente, un crossing-over simple a eu lieu entre B et son centromère. On obtient les quatre types d'asques G, H, I, J en nombres égaux.

4. — Un crossing-over simple a eu lieu dans chaque intervalle : on obtient les douze types d'asques $K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T$, avec les fréquences indiquées dans le tableau.

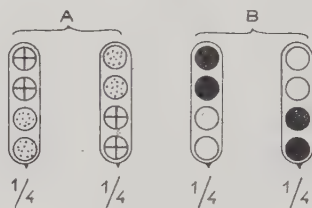
Par conséquent, en ne tenant pas compte de l'orientation par rapport au sommet ou à la base de l'asque, on peut reconnaître vingt types distincts

Bien entendu, si les gènes sont éloignés, il peut se produire des cros-

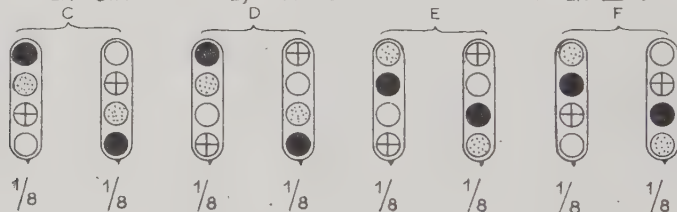
TABLEAU 23_ SEGREGATION DE DEUX GENES INDEPENDANTS
GOUVERNANT LA COULEUR DE L'ASCOSPORE



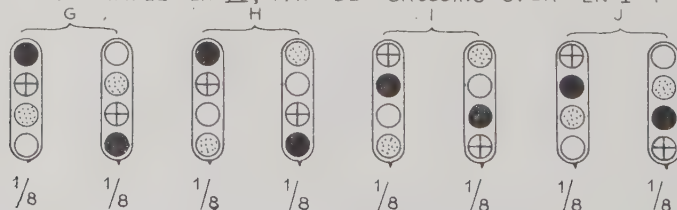
1_PAS DE CROSSING-OVER NI EN I NI EN II :



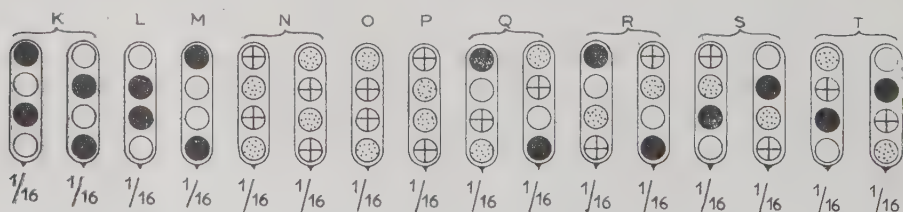
2_CROSSING-OVER SIMPLE EN I, PAS DE CROSSING-OVER EN II :



3_CROSSING-OVER SIMPLE EN II, PAS DE CROSSING-OVER EN I :



4_CROSSING-OVER SIMPLE EN I ET CROSSING-OVER SIMPLE EN II :



sing-over multiples dans l'intervalle qui les sépare de leurs centromères. Cependant, il n'en résulte aucun type d'asque nouveau.

Si l'on fait abstraction des dispositions relatives des spores, on voit que dans le croisement $Ab \times aB$, il y a trois grandes classes d'asques, à savoir :

Classe (1) — Ne renfermant que des spores des types parentaux aB et Ab (quatre de chaque) ;

Classe (2) — Renfermant deux spores (aB), deux spores (Ab), deux spores (AB) et deux spores (ab), c'est-à-dire moitié de types parentaux et moitié de types recombinants.

Classe (3) — Renfermant quatre spores (AB) et quatre spores (ab), c'est-à-dire uniquement des types recombinants.

Etant donné que les deux loci sont indépendants, la première et la troisième de ces classes sont égales, puisque, dans ce cas, le pourcentage de recombinaison :

$$\frac{\text{nombre d'ascospores de types recombinants}}{\text{nombre total d'ascospores}}$$

doit être égal à 50.

Nous sommes maintenant en mesure d'exposer et de discuter les résultats que nous avons obtenus dans l'étude des vingt-huit croisements signalés plus haut. Passons-les successivement en revue :

1°) $bl_1 \times j_1$:

Contrairement aux suppositions faites dans la théorie que nous venons de développer, les asques hybrides issus de ce croisement ne renferment que trois sortes distinctes de spores : blanches, jaunes et noires (voir tableau 27). Cela est aisément explicable. Il suffit d'examiner les asques contenant quatre spores noires. On sait que les quatre autres spores ont le génotype double récessif ($bl_1 j_1$). Or ces spores sont blanches. Par conséquent, le gène bl_1 est épistatique sur le gène j_1 .

Compte non tenu de l'orientation par rapport à la base ou au sommet de l'asque, il y a quatorze types d'asques qui se ramènent aux trois classes principales déjà décrites. Ici nous avons :

Classe (1) : 100

Classe (2) : 224

Classe (3) : 110

Il est manifeste que les classes (1) et (3) sont égales ($\chi^2_{(1)} = 0,45$; $0,50 < P < 0,95$). En conséquence, les deux gènes bl_1 et j_1 sont probablement indépendants.

2°) $bl_1 \times j_2$:

La situation est la même que dans le croisement précédent, c'est-à-dire que bl_1 est épistatique sur j_2 : les spores ($bl_1 j_2$) sont blanches.

Classe (1) : 56

Classe (2) : 133

Classe (3) : 58

Les classes (1) et (3) sont égales, par conséquent, les deux gènes bl_1 et j_2 sont vraisemblablement indépendants.

3°) $bl_1 \times r_1$:

On constate à nouveau que bl_1 est épistatique sur r_1 : les ascospores ($bl_1 r_1$) sont blanches (voir tableau 27 et pl. 34, 35, 36). Nous avons :

Classe (1) : 61

Classe (2) : 182

Classe (3) : 65

Il est manifeste que les classes (1) et (3) sont égales, donc les gènes bl_1 et r_1 sont indépendants.

4°) $bl_1 \times r_2$:

Les spores doubles récessives ($bl_1 r_2$) résultant de ce croisement sont rose très pâle et pourraient être distinguées à la fois de bl_1 et de r_2 . Cependant, le classement étant difficile à faire dans beaucoup d'asques, nous n'avons pas cherché à séparer les spores (bl_1) et ($bl_1 r_2$).

Dans ces conditions, on ne trouve que quatre sortes d'asques, car, à la température à laquelle l'expérience a été faite, le gène r_2 ségrège en première division. Nous avons alors les résultats suivants (voir tableau 28) :

Classe (1) : 31

Classe (2) : 33

Classe (3) : 35

Les classes (1) et (3) sont pratiquement égales et les gènes bl_1 et r_2 sont indépendants.

5°) $bl_1 \times vo_1$:

A nouveau, il serait peut-être possible, dans les cas favorables, de distinguer les spores ($bl_1 vo_1$) des spores (bl_1). Cependant, nous avons évité de le faire (voir tableau 27). Il y a alors quatorze types d'asques, se répartissant dans les trois classes :

Classe (1) : 76

Classe (2) : 338

Classe (3) : 80

Les classes (1) et (3) sont pratiquement égales. Les gènes bl_1 et vo_1 sont par conséquent indépendants.

6°) $bl_1 \times vo_2$:

Les spores ($bl_1 vo_2$) et (bl_1) ne peuvent être distinguées avec certitude. Nous avons obtenu les résultats globaux suivants, sans effectuer un comptage des différents types d'asques :

Classe (1) : 51

Classe (2) : 204

Classe (3) : 47

Les classes (1) et (3) ayant des effectifs à peu près égaux, les deux gènes bl_1 et vo_2 sont indépendants.

7°) $bl_1 \times v_1$:

Nous avons obtenu pour ce croisement les résultats globaux suivants :

Classe (1) : 45

Classe (2) : 196

Classe (3) : 42

Il est manifeste que les gènes bl_1 et v_1 sont indépendants.

8°) $j_1 \times j_2$:

Les deux souches parentes ont des spores jaune clair d'une part, jaune foncé de l'autre. Dans les asques, il n'est pas possible de faire la distinction entre les spores (j_1), (j_2) et ($j_1 j_2$) qui sont jaunes (voir tableau 28). En conséquence, nous n'avons pu identifier que sept types d'asques, se groupant en trois classes comme précédemment :

Classe (1) : 68

Classe (2) : 232

Classe (3) : 69

Il est clair que les gènes j_1 et j_2 sont indépendants.

9°) $j_1 \times r_1$:

Les ascospores de génotype ($j_1 r_1$) sont blanches et peuvent par conséquent être distinguées facilement. Il en résulte que le nombre de types d'asques identifiables est de vingt, comme dans notre schéma théorique (voir tableau 26). Nous avons :

Classe (1) : 97

Classe (2) : 207

Classe (3) : 86

Les classes (1) et (3) sont égales ($\chi^2_{(1)} = 0,66$; $0,30 < P < 0,50$) et les gènes j_1 et r_1 sont indépendants.

10°) $j_1 \times r_2$:

Comme dans le précédent croisement, les ascospores doubles récessives ($j_1 r_2$), qui sont rose pâle, peuvent être aisément distinguées.

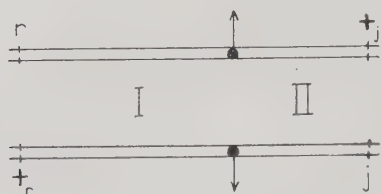
Par ailleurs, à la température de l'expérience, le gène r_2 ségrège toujours en première division. On ne trouve donc que six types d'asques (voir tableau 28), et l'on a :

Classe (1) : 81

Classe (2) : 116

Classe (3) : 73

TABLEAU 24 - ORIGINE DES TYPES D'ASQUES OBSERVES
DANS LE CROISEMENT $r_1 \times j_2$

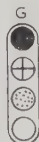


CODE $\left\{ \begin{array}{l} r : \oplus \\ j : \odot \\ + : \bullet \\ rj : \circ \end{array} \right.$

1. PAS DE CROSSING-OVER NI EN I NI EN II



2. UN CROSSING-OVER EN I, PAS DE CROSSING-OVER EN II



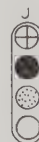
$\frac{1}{4}$



$\frac{1}{4}$



$\frac{1}{4}$



$\frac{1}{4}$

3. PAS DE CROSSING-OVER EN I, UN CROSSING-OVER EN II



$\frac{1}{4}$



$\frac{1}{4}$



$\frac{1}{4}$



$\frac{1}{4}$

4. UN CROSSING-OVER EN I ET UN CROSSING-OVER EN II



$\frac{2}{16}$



$\frac{1}{16}$



$\frac{1}{16}$



$\frac{2}{16}$



$\frac{1}{16}$



$\frac{1}{16}$



$\frac{2}{16}$



$\frac{2}{16}$



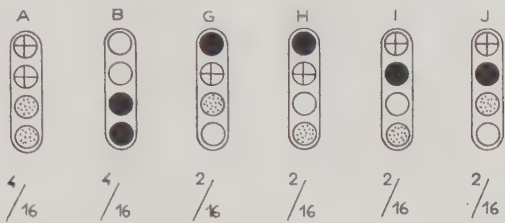
$\frac{2}{16}$



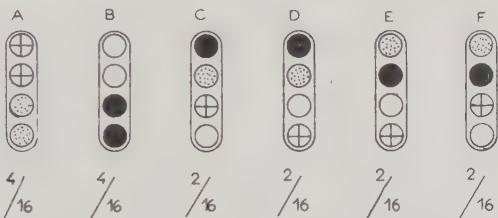
$\frac{2}{16}$

TABLEAU 24 bis_ORIGINE DES TYPES D'ASQUES OBSERVES
 DANS LE CROISEMENT $r_1 \times J_2$ (SUITE)

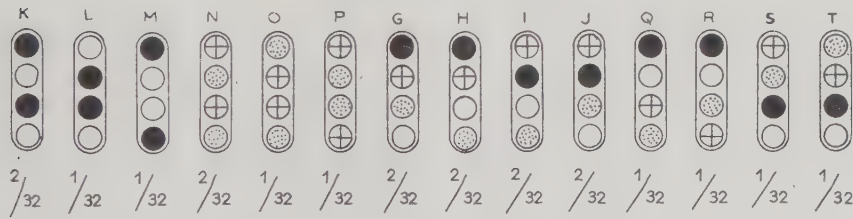
5_CROSSING-OVER DOUBLE EN I, PAS DE CROSSING-OVER EN II



6_PAS DE CROSSING OVER EN I, CROSSING OVER DOUBLE EN II



7_CROSSING-OVER SIMPLE EN I ET CROSSING-OVER DOUBLE EN II



8_CROSSING-OVER DOUBLE EN I ET CROSSING-OVER SIMPLE EN II :

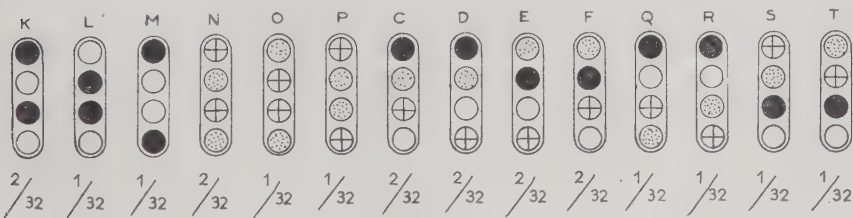
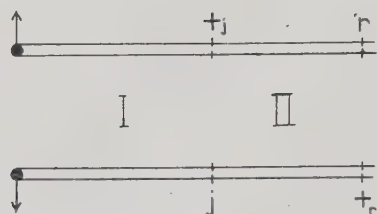


TABLEAU 25 _



CODE

r :	⊕
j :	⊙
+	●
rj :	○

1_PAS DE CROSSING-OVER NI EN I NI EN II :



2_UN CROSSING-OVER EN I PAS DE CROSSING-OVER EN II :



$\frac{1}{2}$



$\frac{1}{4}$



$\frac{1}{4}$

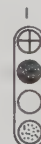
3_PAS DE CROSSING-OVER EN I UN CROSSING-OVER EN II :



$\frac{1}{4}$



$\frac{1}{4}$



$\frac{1}{4}$



$\frac{1}{4}$

4_UN CROSSING-OVER EN I ET UN CROSSING-OVER EN II :



$\frac{1}{8}$



$\frac{1}{8}$



$\frac{1}{8}$



$\frac{1}{8}$



$\frac{1}{8}$



$\frac{1}{8}$



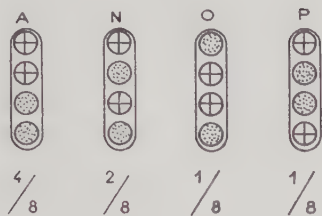
$\frac{1}{8}$



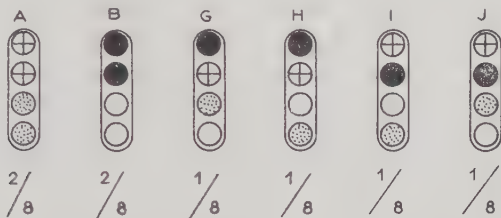
$\frac{1}{8}$

TABLEAU 25 bis _

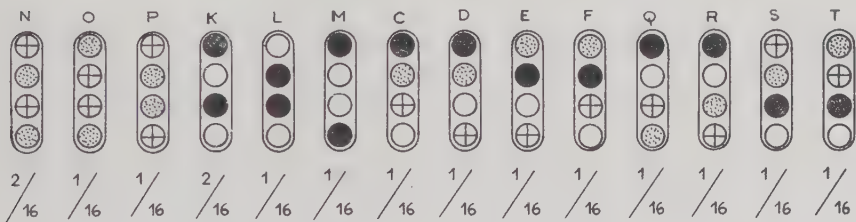
5_CROSSING-OVER DOUBLE EN I, PAS DE CROSSING-OVER EN II :



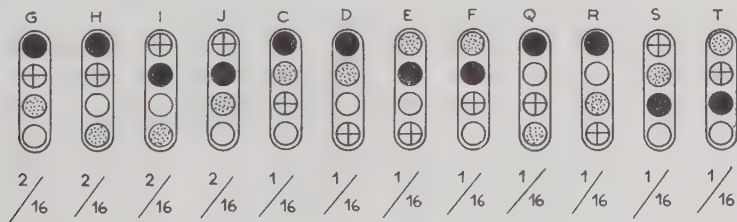
6_ PAS DE CROSSING-OVER EN I, CROSSING-OVER DOUBLE EN II :



7_CROSSING-OVER SIMPLE EN I ET CROSSING-OVER DOUBLE EN II :



8_CROSSING-OVER DOUBLE EN I ET CROSSING-OVER SIMPLE EN II :



Les effectifs des classes (1) et (3) ne sont pas significativement distincts : les gènes j_1 et r_2 peuvent être considérés comme indépendants.

11°) $j_1 \times vo_1$:

Les ascospores de génotype ($j_1 vo_1$) sont aisément reconnaissables, car elles sont blanches (voir tableau 26). Il y a vingt types d'asques distincts avec la répartition suivante :

Classe (1) : 82

Classe (2) : 276

Classe (3) : 105

Les classes (1) et (3) ne sont pas significativement différentes ($\chi^2_1 = 2,82$; $0,05 < P < 0,10$). Les deux gènes j_1 et vo_1 sont indépendants.

12°) $j_1 \times vo_2$:

Pour ce croisement, les fréquences de différents types d'asques n'ont pas été relevées en détail. Les résultats d'ensemble sont les suivants :

Classe (1) : 76

Classe (2) : 295

Classe (3) : 56

Les effectifs des classes (1) et (3) ne paraissent pas significativement différents ($\chi^2_1 = 3,0$; $0,05 < P < 0,10$). Ceci signifie que les gènes j_1 et vo_2 sont vraisemblablement indépendants.

13°) $j_1 \times v_1$:

Dans ce croisement, la ségrégation est difficile à voir. Nous n'avons pas cherché à relever les fréquences individuelles des différents types d'asques. Globalement, les résultats sont les suivants :

Classe (1) : 40

Classe (2) : 149

Classe (3) : 44.

Il ne fait pas de doute que les classes (1) et (3) sont égales. Les gènes j_1 et v_1 sont donc indépendants.

14°) $j_2 \times r_1$:

Les quatre sortes de spores j_2 , r_1 , + et $j_2 r_1$ (blanches) sont facilement distinguables. Il y a donc 20 types d'asques (voir tableau 26) avec la répartition suivante (à $t = 27^\circ\text{C}$) :

A = 169

B = 19

C + D + E + F = 145

G + H + I + J = 244

Q + R + S + T = 103

K + L + M = 61

N + P + O = 68

TABEAU 26 -

CLASSE 1					CLASSE 3					CLASSE 2										
	A	N	P	O	B	K	M	L	C	D	E	F	G	H	I	J	Q	R	S	T
$j_1 \times r_1$	67	15	8	7	63	13	4	6	9	12	23	19	32	40	23	22	8	8	4	7
$j_1 \times vq_1$	52	14	7	9	58	20	11	16	30	22	16	13	55	52	60	51	13	25	20	19
$j_2 \times r_1$	169	24	26	18	19	33	14	14	42	31	44	28	53	55	58	78	25	24	26	28
$j_2 \times vq_1$	48	30	13	7	59	16	15	10	25	26	21	21	49	56	56	51	23	25	22	20

$\oplus$: r_1 ou vq_1
 $\odot$: j_1 ou j_2
 $\circ$: MUTANT DOUBLE
 $\bullet$: +

Ce qui donne globalement :

Classe (1) : 237

Classe (2) : 492

Classe (3) : 80

L'effectif de la classe (1) est très supérieur à celui de la classe (3) ($\chi^2 = 77$; $P \leq 0,01$). Il y a un excès important de spores des deux types parentaux. Il en résulte que les deux gènes j_2 et r_1 sont liés (situés sur le même chromosome). Il importe d'établir s'ils sont localisés ou non dans le même bras chromosomique.

A priori, deux dispositions sont possibles : ou bien les gènes sont situés dans deux bras différents de part et d'autre du centromère (tableaux 24 et 24 bis), ou bien les gènes sont dans le même bras, et — dans ce dernier cas — c'est le gène j_2 qui est le plus proche du centromère (tableaux 25 et 25 bis).

Dans le cadre de chacune de ces hypothèses, les tableaux 24, 24 bis, 25, 25 bis, indiquent les types d'asques à prévoir dans chaque éventualité, ainsi que leurs proportions respectives, l'interférence chromatidique étant supposée nulle.

On note que si les gènes sont de part et d'autre du centromère, on a le rapport suivant :

$$2 (Q + R + S + T) : 1 (K + L + M) : 1 (N + O + P).$$

Dans le cas où les gènes sont dans le même bras, les proportions relatives de ces trois catégories d'asques ne peuvent être prévues *a priori*.

Ici nous avons la répartition :

$$103 : 61 : 68$$

Pour les proportions 2 : 1 : 1, on a : $\chi^2 = 3,32$, c'est-à-dire $0,10 < P < 0,20$. Il existe donc une très forte présomption pour que les deux gènes r_1 et j_2 soient situés de part et d'autre du centromère.

Au surplus, nous pouvons calculer séparément les pourcentages de post-réduction pour les gènes r_1 et j_2 . On a :

$$\text{Gène } r_1 : \frac{476}{809} = 58,8 \text{ (distance non corrigée} = 29,9)$$

$$\text{Gène } j_2 : \frac{377}{809} = 46,6 \text{ (distance non corrigée} = 23,3)$$

D'autre part, le pourcentage de recombinaison entre r_1 et j_2 est de 40,2, et le pourcentage d'asques de type (2) de 60,8, correspondant à une distance non corrigée de 30,4.

En appliquant la méthode de l'expérience dite des trois lieux, on voit que :

$$29,9 + 23,3 = 53,2$$

$$29,9 - 23,3 = 6,6$$

C'est une confirmation du fait que les deux gènes sont situés dans deux bras différents. Il est normal que la distance non corrigée entre r_1 et j_2 (30,4), calculée directement, soit inférieure à la somme des distances au centromère, en raison des crossing-over multiples non détectés comme tels.

Nous avons donc, avec les distances corrigées (et à 27°C) :



Compte tenu de cette disposition, les tableaux 23 et 23 bis fournissent des indications sur l'origine des différents types d'asques observés. On voit que l'événement le plus simple donnant naissance à des asques de type B est un crossing-over double dans les zones I ou II.

15°) $j_2 \times r_2$:

Il est facile de distinguer les quatre sortes de spores j_2 , r_2 , + et $j_2 r_2$ (blanches). Cependant, à la température à laquelle l'expérience a été réalisée, le gène r_2 ségrège toujours en première division. Il en résulte qu'il n'y a que six types d'asques (voir tableau 27). Globalement nous avons :

Classe (1) : 98

Classe (2) : 146

Classe (3) : 98

Les classes (1) et (3) étant égales, les deux gènes j_2 et r_2 sont indépendants.

16°) $j_2 \times vo_1$:

Les quatre sortes de spores j_2 ; vo_1 ; + et $j_2 vo_1$ (blanches) sont identifiables. Il y a vingt types d'asques (voir tableau 26). Nous avons au total :

Classe (1) : 98

Classe (2) : 395

Classe (3) : 100

Les classes (1) et (3) étant pratiquement égales, les deux gènes j_2 et vo_1 sont indépendants.

17°) $j_2 \times vo_2$:

Les fréquences des différents types d'asques n'ont pas été relevées en détail. Les résultats d'ensemble sont les suivants :

Classe (1) : 20

Classe (2) : 84

Classe (3) : 22

Les classes (1) et (3) sont égales ($\chi^2_{(1)} = 0,04$; $0,80 < P < 0,90$). Les deux gènes j_2 et vo_2 sont donc indépendants.

18°) $j_2 \times v_1$:

La ségrégation étant difficile à voir, les fréquences des différents types d'asques n'ont pas été relevées en détail. Nous avons trouvé :

Classe (1) : 56

Classe (2) : 200

Classe (3) : 45

Les effectifs des classes (1) et (3) ne sont pas significativement différents ($\chi^2_2 = 1,19$; $0,2 < P < 0,30$). Les gènes j_2 et v_1 sont donc indépendants.

19°) $r_1 \times r_2$:

On ne peut distinguer avec certitude que trois types de spores : noires (+), roses (r_1) et blanches (r_2 et $r_1 r_2$). D'autre part, à la température de l'expérience, le gène r_2 a toujours ségrégué en première division. Seuls quatre types d'asques ont été rencontrés (voir tableau 28). On a trouvé :

Classe (1) : 79

Classe (2) : 238

Classe (3) : 99

Les effectifs des classes (1) et (3) ne diffèrent pas de façon significative ($\chi^2_1 = 2,24$; $0,10 < P < 0,20$). Les deux gènes r_1 et r_2 sont indépendants.

20°) $r_1 \times vo_1$:

On ne distingue que trois sortes de spores, à savoir : noire (+), vert-olive (vo_1) et roses (r_1 et $r_1 vo_1$). Il y a quatorze types d'asques (voir tableau 27). Au total :

Classe (1) : 141

Classe (2) : 602

Classe (3) : 122

Les classes (1) et (3) peuvent être considérées comme égales ($\chi^2_1 = 1,37$; $0,20 < P < 0,30$). Les deux gènes r_1 et vo_1 sont donc indépendants.

21°) $r_1 \times vo_2$:

Les fréquences des différents types d'asques n'ont pas été relevées en détail. Au total on a :

Classe (1) : 19

Classe (2) : 87

Classe (3) : 18

Les effectifs des classes (1) et (3) sont pratiquement égaux. Les deux gènes r_1 et vo_2 sont donc indépendants.

22°) $r_1 \times v_1$:

La ségrégation est difficile à voir. Pour cette raison, les différents types d'asques n'ont pas été relevés en détail. Au total nous avons :

TABLEAU 28 _

							
$j_1 \times j_2$	68	53	8	6	6	101	131

$\begin{cases} \bigcirc : j_1 ; j_2 \text{ ET } j_1 j_2 \\ \bullet : + \end{cases}$

						
$j_1 \times r_2$	81	73	26	35	26	29
$j_2 \times r_2$	98	98	37	39	44	26
$r_2 \times VO_1$	87	98	102	105	116	103

$\begin{cases} \bullet : + \\ \odot : j_1 ; j_2 ; VO_1 \end{cases} \quad \begin{cases} \oplus : r_2 \\ \bigcirc : \text{DOUBLE MUTANT} \end{cases}$

				
$bl_1 \times r_2$	31	35	18	15

$\text{CODE} \begin{cases} \bullet : + \\ \oplus : r_2 \\ \bigcirc : bl_1 \text{ ET } bl_1 r_2 \end{cases}$

				
$r_1 \times r_2$	79	99	113	125

$\text{CODE} \begin{cases} \bullet : + \\ \oplus : r_1 \\ \bigcirc : r_2 \text{ ET } r_1 r_2 \end{cases}$

Classe (1) : 37

Classe (2) : 119

Classe (3) : 37

Les classes (1) et (3) étant égales, les deux gènes r_1 et v_1 sont indépendants.

23°) $r_2 \times vo_1$:

On distingue quatre sortes de spores, à savoir : noires (+), vert-olive (vo_1), rose (r_2), blanc ($r_2 vo_1$). Cependant, à la température à laquelle l'expérience a été effectuée, le gène r_2 ségrège constamment en première division. Il en résulte qu'on ne rencontre que six types d'asques (voir tableau 28). On a :

Classe (1) : 87

Classe (2) : 426

Classe (3) : 98

Les effectifs des classes (1) et (3) ne diffèrent pas de façon significative ($\chi_1^2 = 0,65$; $0,30 < P < 0,50$). Les deux gènes r_2 et vo_1 sont donc indépendants.

24°) $r_2 \times vo_2$:

Les fréquences des différentes sortes d'asques n'ont pas été relevées en détail. Globalement, nous avons trouvé :

Classe (1) : 49

Classe (2) : 202

Classe (3) : 48

Les classes (1) et (3) étant égales, les deux gènes r_2 et vo_2 sont indépendants.

25°) $r_2 \times v_1$:

La ségrégation étant difficile à voir, nous n'avons pas cherché à relever en détail les fréquences des différentes sortes d'asques. Au total, nous avons trouvé (à $t = 28^\circ 5$) :

Classe (1) : 50

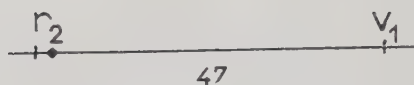
Classe (2) : 72

Classe (3) : 8

Il y a une forte inégalité des classes (1) et (3) ($\chi_1^2 = 30,4$ $P \leq 0,01$). Par conséquent, les gènes r_2 et vo_1 sont liés (situés sur le même chromosome). Le pourcentage de recombinaison est de 33,8 et le pourcentage d'asques de types (2) est de 55,3 (distance corrigée = 31,2).

Nous avons établi précédemment que le gène r_2 est très proche de son centromère (% de post-réduction = 0,67 à 27°C), alors que le gène v_1 en est très éloigné (% de post-réduction = 66,6 à 27°C).

Compte tenu de la précision avec laquelle les distances sont connues, il n'est pas possible de dire si r_2 et v_1 sont ou non dans le même bras. Nous adopterons arbitrairement la disposition :



26°) $vo_1 \times vo_2$:

Nous n'avons pas distingué les différentes sortes d'asques. Au total, nous avons trouvé :

Classe (1) : 46

Classe (2) : 187

Classe (3) : 52

Les effectifs des classes (1) et (3) ne sont pas significativement différents ($\chi^2_1 = 0,36$; $0,50 < P < 0,70$). Les gènes vo_1 et vo_2 sont donc indépendants.

27°) $vo_1 \times v_1$:

La ségrégation étant difficile à voir, nous n'avons pas relevé en détail les différentes sortes d'asques. Au total, nous avons trouvé :

Classe (1) : 37

Classe (2) : 160

Classe (3) : 36

Les classes (1) et (3) étant pratiquement égales, les deux gènes vo_1 et v_1 sont indépendants.

28°) $vo_2 \times v_1$:

La ségrégation est difficile à voir. Nous n'avons pas distingué les différentes sortes d'asques dans le détail. Globalement, nous avons :

Classe (1) : 45

Classe (2) : 173

Classe (3) : 40

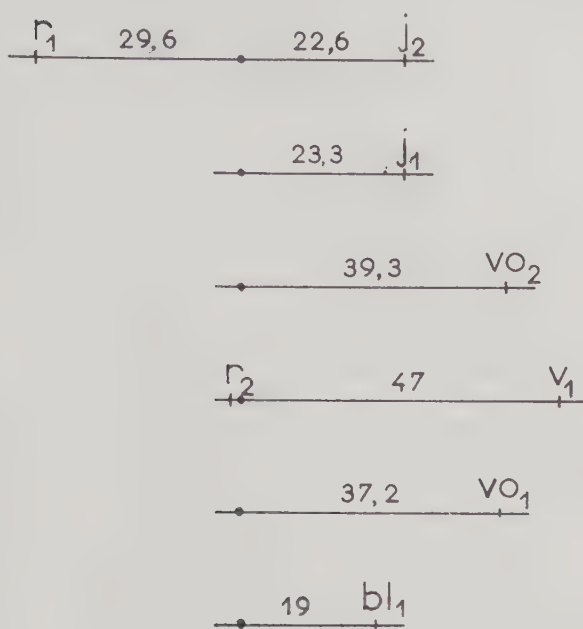
Les effectifs des classes (1) et (3) sont pratiquement identiques ($\chi^2_1 = 0,29$; $0,50 < P < 0,70$). Les deux gènes vo_1 et v_1 sont donc indépendants.

En définitive, les huit gènes bl_1 , j_1 , j_2 , r_1 , r_2 , vo_1 , vo_2 , v_1 , se trouvent répartis en six groupes de liaison. Les distances indiquées correspondant à la température de 21-23°C. Il s'agit des valeurs corrigées, obtenues à partir du graphique de BARRATT et al. Rappelons qu'une ambiguïté subsiste à propos des gènes vo_1 , vo_2 et v_1 , très éloignés de leurs centromères respectifs.

Ces six groupes semblent indépendants les uns des autres.

Toutefois, on ne peut exclure *a priori* la possibilité que deux gènes paraissant indépendants soient en fait localisés aux deux extrémités opposées d'un même chromosome.

Mais, pour le moment, nous pouvons considérer que les six groupes précédents sont distincts. La situation est donc particulièrement favorable puisque six chromosomes sur sept portent au moins un gène marqueur.



Nous allons voir maintenant de quelle façon ce système de référence a été utilisé pour la localisation d'autres gènes.

b) LES MUTANTS A CROISSANCE LENTE (ACRIDINE)

Les vingt mutants A-1 A-20 obtenus sous l'action de l'acridine ont fait l'objet d'une étude génétique détaillée en vue de les placer dans les différents groupes de liaison.

Nous avons constamment opéré en deux étapes :

1) Recherche des liaisons

Nous avons vu qu'un zygote Ab/aB peut conduire à trois sortes de tétrades (1), (2) et (3). Les types (1) et (3) sont également probables si les gènes sont indépendants. Pour déterminer si les loci A/a et B/b sont liés, il suffit de voir si les effectifs des classes (1) et (3) sont significativement différents. C'est là un critère sûr et efficace, comme PERKINS l'a montré (120).

On pourrait songer à utiliser le pourcentage de recombinaison entre les deux loci, calculé sur l'ensemble des asques analysés, en déterminant s'il y a ou non égalité entre le nombre de spores parentales et celui des spores

recombinantes. Cependant, cela reviendrait à inclure les spores issues des asques de type (2). Or, ces asques renferment autant de spores recombinantes que de spores parentales et ne donnent eux-mêmes aucune information sur l'existence d'une liaison. Leur inclusion est donc susceptible de masquer une liaison lorsque celle-ci est faible.

En ce qui concerne plus spécialement les mutants à croissance lente, chacun d'eux a été croisé successivement avec les marqueurs du système de référence. Prenons, à titre d'exemple, le cas du croisement $(+_{bl}) (l) \times (bl) (+)$. Pour la détection des liaisons, on pourrait songer à étudier des asques entiers, en déterminant les divers types (1), (2) et (3). Toutefois, la ségrégation pour le couple $bl / +_{bl}$ étant directement visible dans les asques hybrides, on peut se contenter de disséquer et de repiquer seulement les deux couples de spores noires de chaque asque (nous avons choisi les spores noires car elles sont moins fragiles et ont une meilleure germination).

Dès la germination, il est possible de dire si la croissance est lente (l) ou de type sauvage (+). On peut alors distinguer trois sortes de couples :

$$(+)-(+) ; (+)-(l) ; (l)-(l)$$

dont il est facile de mesurer les fréquences. Dans le cas où le gène entraîne la non-germination des ascospores, les trois types d'asques deviennent

$$(+)-(+) ; (+)-(O) ; (O)-(O)$$

c'est ce qui a lieu avec A - 1, A - 7, A - 15.

Dans les deux cas, il suffit de tester l'égalité des deux types extrêmes pour déterminer s'il y a ou non liaison entre $(+ / bl)$ et $(+ / l)$. En effet, si le gène mutant considéré est indépendant du marqueur avec lequel il a été confronté, les asques des types $(+)-(+)$ et $(l)-(l)$ doivent être également fréquents. Si, au contraire, le gène mutant et le marqueur sont situés sur le même chromosome, le type $(l)-(l)$ sera beaucoup plus fréquent que le type $(+)-(+)$.

En fait, il est encore techniquement plus intéressant de sélectionner parmi les asques hybrides ceux du type ●●●●○○○○ dont on repique les deux couples de spores noires. On rencontre à nouveau les trois classes $(+)-(+) ; (+)-(l) ; (l)-(l)$. L'existence d'une liaison est déterminée par la comparaison des fréquences des classes extrêmes. En cas d'indépendance, les données permettent de mesurer le pourcentage de post-réduction pour le locus $+_1 / l$, ce qui est un avantage supplémentaire.

2) Mesure du pourcentage de recombinaison

Lorsqu'une liaison a été établie, nous mesurons le pourcentage de recombinaison. Nous nous bornons à prélever *au hasard* des asques dont nous repiquons les quatre spores noires, par groupes de deux. Ce choix des spores noires a simplement pour but de s'assurer un pourcentage maximum de germination. Les écarts-types des pourcentages de recombinaison ont été calculés selon la méthode indiquée par MATHER et BEALE (104).

Le procédé de détection des liaisons que nous avons exposé ci-dessus présente des avantages certains sur la mesure directe des pourcentages de recombinaison. En effet, cette méthode est beaucoup plus sensible et permet d'établir, avec une relative facilité, l'existence de liaisons entre gènes, même lorsque ces derniers sont très éloignés (pourcentage de recombinaison voisin de 50 %).

Résultats

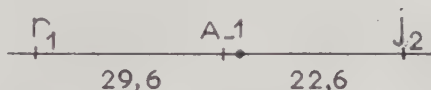
Les tableaux 29 à 38 résument l'ensemble des résultats. Signalons que pour la recherche des liaisons, la température n'a pas été contrôlée avec précision. Par contre, pour les mesures des pourcentages de recombinaison, nous avons opéré à 21-23° C.

Passons rapidement en revue les différents gènes :

A - 1 et A - 18 :

Liés à la fois à r_1 et j_2 . Leurs positions sur le chromosome ne sont pas significativement différentes. Ils sont, l'un et l'autre, très proches du centromère (distance corrigée = 0,5). Par confrontation de ces deux souches, on n'obtient pas d'hétérocaryote de type sauvage, à croissance rapide. Il semble donc probable que ces deux gènes sont allèles. Les résultats ne permettent pas d'établir si le locus est situé du côté de r_1 ou du côté de j_2 .

Adoptons arbitrairement la disposition :



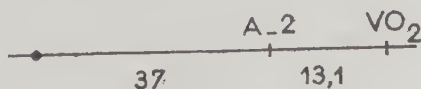
A - 2 :

Lié au gène vo_2 (pourcentage de recombinaison = 12,5 ; distance corrigée = 13,1). Par ailleurs, nous savons que :

Distance corrigée de A - 2 au centromère = 37	} à
Distance corrigée de vo_2 au centromère = 39,3	

21-23°C

Il est certain que A - 2 et vo_2 sont dans le même bras chromosomique. Essayons de déterminer celui des deux qui est le plus proche du centromère. Il semble que ce soit A - 2, puisque son pourcentage de post-réduction (63,1) est inférieur à celui (66,2) de vo_2 . Toutefois, la différence n'est pas significative au seuil 5 %. La disposition suivante n'est donc acceptée que sous réserve de modification ultérieure :



A - 3, A - 4, A - 6, A - 8, A - 11, A - 12, A - 13, A - 14, A - 20 :

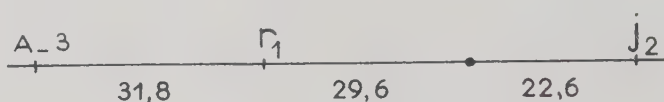
Ces neuf gènes sont liés à la fois à r_1 et à j_2 . Leurs positions sur le chromosome ne sont pas significativement différentes. En confrontant ces souches deux à deux, on n'obtient pas d'hétérocaryote à croissance rapide, de type sauvage. Il semble donc légitime de conclure qu'il s'agit d'allèles. Globalement, les pourcentages de recombinaison sont les suivants :

avec r_1 : 29,2 (distance corrigée : 31,8)

avec j_2 : 43,8

Ainsi, le locus est presque indépendant de j_2 . On constate par ailleurs qu'il est éloigné du centromère (% de post-réduction = 73 %), beaucoup plus en tous cas que r_1 et j_2 .

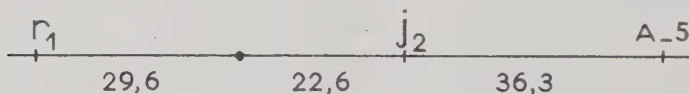
Il en résulte que la disposition ne peut être que la suivante (à 21-23° C). Nous avons indiqué les distances corrigées :



A - 5 :

Ce gène est lié à j_2 (% de recombinaison = 37,6 ; distance corrigée = 36,3). Cependant, il ne montre pas de liaison évidente avec r_1 . Il est très éloigné du centromère (% de post-réduction = 73,1), nettement plus que r_1 et j_2 .

Il en résulte que la position du locus ne peut être que la suivante :



A - 7 :

Ce gène semble bien être faiblement lié à j_1 (% = 46,0). Il n'est pas possible de dire s'il se trouve dans le même bras chromosomique que j_1 lui-même.

A - 9 :

Ce gène se montre indépendant des huit loci du système de référence. Il est possible qu'il soit localisé dans le septième groupe pour lequel nous n'avons pas encore de marqueur.

A - 10 :

Apparaît faiblement lié à r_1 (% = 47,7). On ne peut dire s'il est localisé dans le même bras que r_1 ou dans un bras différent.

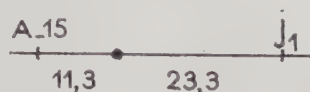
A - 15 :

Ce gène est lié à j_1 (% de recombinaison = 34,3 ; distance corrigée = 33,7). Nous savons aussi qu'à 21°-23°C on a :

Distance corrigée de A - 15 au centromère = 11,3

Distance corrigée de j_1 au centromère = 23,3

La position relative des gènes ne peut donc être que la suivante :



A - 16 :

Ce locus paraît être très faiblement lié à j_2 ($\% = 48,9$). Il y a aussi une indication d'une faible liaison avec r_1 ($\chi^2 = 2,66$; $0,10 < P < 0,20$). Il semble donc que le gène A - 16 soit localisé sur le chromosome $r_1 j_2$ dans le même bras que j_2 et loin du centromère.

A - 17 :

Ce gène est faiblement lié à j_2 ($\% = 44,1$). Il se comporte comme indépendant de r_1 . Il est probablement localisé dans le même bras que j_2 et loin du centromère.

Les deux gènes A - 16 et A - 17 paraissent donc situés dans la même région. Ils ne sont pas allèles, car l'hétérocaryote (A - 16 $\times$ A - 17) a une croissance rapide comparable à celle du type sauvage.

A - 19 :

Ce gène est lié à j_1 ($\%$ de recombinaison = 24,5 ; distance corrigée = 25,9) et nous savons par ailleurs que l'on a (à 21-23°C) :

Distance corrigée de A - 19 au centromère = 0,2

Distance corrigée de j_1 au centromère = 23,3

Compte tenu de la précision avec laquelle ces distances sont connues, il n'est pas possible de dire si A - 19 et j_1 sont ou non dans le même bras chromosomique. Nous admettons provisoirement que la disposition est la suivante :



c) AUTRES GÈNES

Nous n'avons pas cherché à localiser les autres gènes par rapport aux marqueurs du système de référence. En effet, d'une part la localisation de ces gènes ne nous a pas paru présenter un intérêt majeur, et, d'autre part, il en serait résulté un travail matériel considérable, une souche monospore ne

pouvant être classée qu'après fructification, ce qui exige un tube de culture par spore étudiée.

Cependant, un problème important se pose, celui de la continuité génétique du centrosome. On peut en effet se demander si cet organite, que nous avons vu se diviser au cours de chaque interphase, dans l'asque, a sous son contrôle *direct* certains caractères héréditaires.

Si tel est le cas, les caractères en cause doivent concerner le fuseau et la délimitation des spores, à savoir : la direction des fuseaux, la taille, la forme et le nombre des ascospores.

Parmi les mutants dont nous disposons, nous avons donc choisi les dix suivants : ds_1 ; ds_2 ; ds_3 ; sps_1 ; sps_2 ; sps_3 ; spp_1 ; as_1 ; spa_1 ; ir_1 .

A priori, rien n'indique que chacun de ces dix mutants corresponde à une modification héréditaire du centrosome lui-même. Nous avons vu, en effet, que ces souches sont porteuses de mutations géniques simples, puisqu'on observe des ségrégations régulières dans les croisements avec la souche sauvage. De plus, nous savons que le centrosome, Feulgen négatif, ne renferme pas d'acide désoxyribonucléique, substance caractéristique des gènes.

Cependant l'apparente continuité du centrosome et le fait (démonstré par HARPER chez *Phyllactinia corylea*) que les deux centrosomes, présents dans le noyau de fusion, s'apparient en prophase I, au même titre que les chromosomes, nous ont induit à pousser plus loin l'analyse.

En supposant que les dix gènes mentionnés ci-dessus soient tous localisés sur le centrosome (et non sur les chromosomes), ils doivent constituer un unique groupe de liaison.

C'est pourquoi nous avons confronté deux à deux les dix souches précédentes, ce qui représente quarante-cinq croisements distincts. Les asques hybrides entre deux quelconques de ces souches sont aisément identifiables puisqu'ils ressemblent aux asques de la souche sauvage.

Deux procédés d'analyse ont été employés : soit l'analyse individuelle complète d'une série d'asques hybrides, soit le repiquage de spores prélevées au hasard dans les asques hybrides. On peut ainsi déterminer, dans chaque cas, si les gènes sont liés ou indépendants. Avec la première méthode, et en désignant par m_1 et m_2 les mutants confrontés, il suffit de tester l'égalité des fréquences des asques (m_1 ; m_1 ; m_2 ; m_2) et (+ ; + ; m_1m_2 ; m_1m_2). Avec la deuxième méthode, les effectifs groupés de ($(m_1) + (m_2)$) et ((+) + m_1m_2) sont comparés.

Les résultats sont indiqués dans les tableaux 39 à 47. On constate que deux liaisons seulement ont été établies, à savoir :

entre sps_1 et spp_1 : % = 33,8 ;

entre sps_3 et ir_1 : % = 18,5.

Les six autres gènes semblent mutuellement indépendants. Toutefois,

le nombre de spores analysées restant peu élevé dans chaque cas, il est probable que certaines liaisons nous ont échappé.

A titre de comparaison, rappelons que nous avons trouvé une situation à peu près semblable pour les gènes commandant la couleur de l'ascospore. Ces huit gènes montrent deux liaisons distinctes et sont, au total, répartis en six groupes.

Il semble donc légitime de conclure que les dix gènes considérés ne font pas partie d'un unique groupe de liaison. Leur comportement suggère qu'ils sont distribués sur les sept chromosomes de *S. macrospora*. Ainsi, il n'y a pas de raison de supposer que le centrosome est le support de caractères héréditaires.

En définitive, les résultats que nous venons de mentionner tendent aux mêmes conclusions que l'étude cytologique : il ne semble pas qu'on puisse considérer le centrosome comme une particule douée de continuité génétique. Son comportement est gouverné par certains gènes chromosomiques et sa multiplication ne semble pas pouvoir se poursuivre de façon indéfinie en l'absence de chromosomes.

d) LA CARTE GÉNIQUE

En conclusion, nous pouvons dresser la carte génique de *S. macrospora* (voir tabl. 48). Sur les sept groupes de liaison auxquels on doit s'attendre, six ont été identifiés. Le groupe n° 1, qui comporte un grand nombre de gènes, correspond probablement au chromosome le plus long que nous avons observé cytologiquement lors de l'étude de la méiose.

TABLEAU 29_

GENE A_1:

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES + + ET 0 0	CONCLUSION
	+ +	+ 0	0 0		
A_1 x bl ₁	45	1	50	$\chi^2_1 = 0,13$; $0,70 < P < 0,80$	INDEP
A_1 x j ₂	1	0	72	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A_1 x r ₁	1	4	43	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A_1 x r ₂	109	1	126	$\chi^2_1 = 1,22$; $0,20 < P < 0,30$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	+ +	+ 0	0 0	
A_1 x r ₁	6	101	93	$28,2 \pm 1,9$
A_1 x j ₂	3	63	78	$23,9 \pm 2,2$

GENE A_2

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES + + ET l l	CONCLUSION
	+ +	+ l	l l		
A_2 x bl ₁	15	56	10	$\chi^2_1 = 1,0$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A_2 x j ₁	15	45	13	$\chi^2_1 = 0,14$; $0,70 < P < 0,80$	INDEP.
A_2 x j ₂	9	26	7	$\chi^2_1 = 0,25$; $0,50 < P < 0,70$	INDEP.
A_2 x r ₁	5	24	5	$\chi^2_1 = 0$, $P = 1$	INDEP.
A_2 x r ₂	23	69	21	$\chi^2_1 = 0,09$; $0,70 < P < 0,80$	INDEP.
A_2 x VO ₁	16	34	9	$\chi^2_1 = 0,98$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A_2 x VO ₂	0	9	32	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	+ +	+ l	l l	
A_2 x VO ₂	0	12	36	$12,5 \pm 3,1$

TABLEAU 30

GENE A₃ :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET ll	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A ₃ × bl ₁	6	24	6	$\chi^2_1 = 0$; P=1	INDEP.
A ₃ × r ₁	0	25	18	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A ₃ × r ₂	14	107	11	$\chi^2_1 = 0,36$; 0,50 < P < 0,70	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+l	ll	
A ₃ × r ₁	2	81	59	29,9 ± 2,2
A ₃ × j ₂	21	124	43	44,1 ± 2

GENE A₄ :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET ll	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A ₄ × r ₁	3	55	17	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A ₄ × r ₂	14	90	14	$\chi^2_1 = 0$; P=1	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+l	ll	
A ₄ × r ₁	2	74	63	28,0 ± 2,2
A ₄ × j ₂	15	170	40	44,4 ± 1,6

TABLEAU 31_

GENE A-5 :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES + + ET l l	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A-5 $\times$ bl ₁	10	50	14	$\chi^2_1=0,66$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A-5 $\times$ j ₁	6	51	9	$\chi^2_1=0,60$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A-5 $\times$ j ₂	0	27	13	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A-5 $\times$ r ₁	5	33	7	$\chi^2_1=0,81$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A-5 $\times$ r ₂	26	194	36	$\chi^2_1=1,61$; $0,20 < P < 0,30$	INDEP.
A-5 $\times$ VO ₁	14	45	8	$\chi^2_1=1,63$; $0,20 < P < 0,30$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+l	ll	
A-5 $\times$ j ₂	5	48	24	$37,6 \pm 3,2$

GENE A-6 :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES + + ET l l	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A-6 $\times$ bl ₁	10	45	14	$\chi^2_1=0,66$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A-6 $\times$ r ₁	2	50	16	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A-6 $\times$ r ₂	6	38	7	$\chi^2_1=0,03$; $0,80 < P < 0,90$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+l	ll	
A-6 $\times$ r ₁	1	67	61	$26,7 \pm 2,3$
A-6 $\times$ j ₂	15	100	28	$45,4 \pm 2,2$

TABLEAU 32_

GENE A_7:

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET 00	CONCLUSION
	++	+0	00		
A-7 x bl ₁	12	71	13	$\chi^2_{.1}=0,04$; $0,80 < P < 0,90$	INDEP.
A-7 x j ₁	9	50	21	$\chi^2_{.1}=4,8$; $0,01 < P < 0,05$	LIAISON
A-7 x j ₂	8	53	10	$\chi^2=0,22$; $0,50 < P < 0,70$	INDEP.
A-7 x r ₁	15	67	14	$\chi^2_{.1}=0,05$; $0,80 < P < 0,90$	INDEP.
A-7 x r ₂	8	32	8	$\chi^2_{.1}=0$; $P=1$	INDEP.
A-7 x VO ₁	7	28	5	$\chi^2_{.1}=0,33$; $0,50 < P < 0,70$	INDEP.
A-7 x VO ₂	5	32	6	$\chi^2_{.1}=0,09$; $0,70 < P < 0,80$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+0	00	
A-7 x j ₁	32	147	50	46,0 ± 1,9

GENE A_8:

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET ll	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A-8 x bl ₁	11	49	16	$\chi^2_{.1}=0,92$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A-8 x r ₁	0	34	25	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A-8 x r ₂	9	54	6	$\chi^2_{.1}=0,60$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+l	ll	
A-8 x r ₁	2	96	72	29,4 ± 2
A-8 x j ₂	16	172	41	44,5 ± 1,6

TABLEAU 33_

GENE A_9 :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET ll	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A_9 x bl ₁	8	13	8	$\chi^2_1=0$; $P=1$	INDEP.
A_9 x j ₁	15	63	13	$\chi^2_1=0,14$; $0,70 < P < 0,80$	INDEP.
A_9 x j ₂	7	25	9	$\chi^2_1=0,25$; $0,50 < P < 0,70$	INDEP.
A_9 x r ₁	19	38	11	$\chi^2_1=2,13$; $0,10 < P < 0,20$	INDEP.
A_9 x r ₂	23	80	18	$\chi^2_1=0,60$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A_9 x VO ₁	7	36	8	$\chi^2_1=0,06$; $0,80 < P < 0,90$	INDEP.
A_9 x VO ₂	10	26	9	$\chi^2_1=0,05$; $0,80 < P < 0,90$	INDEP.
A_9 x V ₁	6	25	5	$\chi^2_1=0,09$; $0,70 < P < 0,80$	INDEP.

GENE A_10 :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET ll	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A_10 x bl ₁	13	80	17	$\chi^2_1=0,53$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A_10 x j ₁	32	58	20	$\chi^2_1=2,76$; $0,05 < P < 0,10$	INDEP.
A_10 x r ₁	22	120	42	$\chi^2_1=6,2$; $0,01 < P < 0,05$	LIAISON
A_10 x r ₂	34	110	37	$\chi^2_1=0,12$; $0,70 < P < 0,80$	INDEP.
A_10 x VO ₁	48	101	39	$\chi^2_1=0,93$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A_10 x VO ₂	14	54	18	$\chi^2_1=0,50$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+l	ll	
A_10 x r ₁	21	66	26	$47,7 \pm 3$

TABLEAU 34_

GENE A₁₁ :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET LL	CONCLUSION
	++	+L	LL		
A ₁₁ x bl ₁	6	10	6	$\chi^2_1=0$; $P=1$	INDEP.
A ₁₁ x r ₁	2	42	18	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A ₁₁ x r ₂	15	80	21	$\chi^2_1=1,0$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+L	LL	
A ₁₁ x r ₁	5	100	74	$30,7 \pm 2$
A ₁₁ x j ₂	20	140	53	$42,2 \pm 1,9$

GENE A₁₂ :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ LL	CONCLUSION
	++	+L	LL		
A ₁₂ x bl ₁	7	26	6	$\chi^2_1=0,07$; $0,70 < P < 0,80$	INDEP.
A ₁₂ x r ₁	0	19	11	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A ₁₂ x r ₂	20	93	16	$\chi^2_1=0,44$; $0,50 < P < 0,70$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+L	LL	
A ₁₂ x r ₁	2	72	62	$27,9 \pm 2,2$
A ₁₂ x j ₂	25	178	52	$44,7 \pm 1,7$

TABLEAU 35 -

GENE A₁₃ :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET ll	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A ₁₃ × r ₁	7	76	32	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A ₁₃ × j ₂	13	54	7	$\chi^2_1 = 1,80$; $0,10 < P < 0,20$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+l	ll	
A ₁₃ × r ₁	2	77	51	31,1 ± 2,2
A ₁₃ × j ₂	19	136	50	42,4 ± 1,7

GENE A₁₄ :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET ll	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A ₁₄ × r ₁	2	45	19	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A ₁₄ × r ₂	10	56	9	$\chi^2_1 = 0,05$; $0,80 < P < 0,90$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+l	ll	
A ₁₄ × r ₁	0	107	75	29,3 ± 1,8
A ₁₄ × j ₂	14	107	37	42,7 ± 2,2

TABLEAU 36_

GENE A₁₅:

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET 00	CONCLUSION
	++	+0	00		
A ₁₅ × bl ₁	32	22	42	$\chi^2_1 = 1,35$; $0,20 < P < 0,30$	INDEP.
A ₁₅ × j ₁	1	21	53	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A ₁₅ × j ₂	34	30	46	$\chi^2_1 = 1,80$; $0,10 < P < 0,20$	INDEP.
A ₁₅ × r ₂	55	21	52	$\chi^2_1 = 0,08$; $0,70 < P < 0,80$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+0	00	
A ₁₅ × j ₁	4	47	29	34,3 ± 3,1

GENE A₁₆:

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET ll	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A ₁₆ × bl ₁	8	34	11	$\chi^2_1 = 0,47$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A ₁₆ × j ₁	17	58	15	$\chi^2_1 = 0,12$; $0,70 < P < 0,80$	INDEP.
A ₁₆ × j ₂	0	41	6	DIFFER. SIGNIFICATIVE	LIAISON
A ₁₆ × r ₁	8	51	16	$\chi^2_1 = 2,66$; $0,10 < P < 0,20$	INDEP.?
A ₁₆ × r ₂	26	124	23	$\chi^2_1 = 0,18$; $0,50 < P < 0,70$	INDEP.
A ₁₆ × VO ₁	15	84	16	$\chi^2_1 = 0,03$; $0,80 < P < 0,90$	INDEP.
A ₁₆ × VO ₂	10	35	5	$\chi^2_1 = 1,66$; $0,10 < P < 0,20$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+l	ll	
A ₁₆ × j ₂	7	32	8	48,9 ± 4,1
A ₁₆ × r ₁	8	31	9	48,9 ± 4,3

TABLEAU 37_

GENE A_17 :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES + + ET l l	CONCLUSION
	+ +	+ l	l l		
A-17 x bl ₁	12	25	10	$\chi^2_1 = 0,18$; $0,50 < P < 0,70$	INDEP.
A-17 x j ₁	11	73	11	$\chi^2_1 = 0$; $P = 1$	INDEP.
A-17 x j ₂	6	74	15	$\chi^2_1 = 3,85$; $0,01 < P < 0,05$	LIAISON
A-17 x r ₁	12	45	14	$\chi^2_1 = 0,15$; $0,50 < P < 0,70$	INDEP.
A-17 x r ₂	11	30	6	$\chi^2_1 = 0,47$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A-17 x VO ₁	11	54	8	$\chi^2_1 = 0,23$; $0,50 < P < 0,70$	INDEP.
A-17 x VO ₂	6	28	11	$\chi^2_1 = 1,47$; $0,20 < P < 0,30$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	+ +	+ l	l l	
A-17 x j ₂	16	74	30	$44,1 \pm 2,8$

GENE A_18 :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES + + ET l l	CONCLUSION
	+ +	+ l	l l		
A-18 x bl ₁	98	3	83	$\chi^2_1 = 1,24$; $0,20 < P < 0,30$	INDEP.
A-18 x r ₁	4	0	103	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A-18 x r ₂	107	3	120	$\chi^2_1 = 0,74$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A-18 x j ₂	1	0	90	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	+ +	+ l	l l	
A-18 x r ₁	0	88	56	$30,5 \pm 2,1$
A-18 x j ₂	4	89	130	$21,7 \pm 1,8$

TABLEAU 38_

GENE A_19 :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET ll	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A_19 x j ₁	3	0	101	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A_19 x r ₁	41	0	50	$\chi^2_{1}=0,89$; $0,30 < P < 0,50$	INDEP.
A_19 x r ₂	37	0	43	$\chi^2_{1}=0,45$; $0,50 < P < 0,70$	INDEP.
A_19 x VO ₁	34	1	33	$\chi^2_{1}=0,01$; $0,90 < P < 0,95$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+l	ll	
A_19 x j ₁	2	49	53	25,4 ± 2,6

GENE A_20 :

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			EGALITE DES TYPES ++ ET ll	CONCLUSION
	++	+l	ll		
A_20 x r ₁	1	55	16	DIFFER. HAUT ^T SIGNIFIC.	LIAISON
A_20 x r ₂	11	56	10	$\chi^2_{1}=0,04$; $0,80 < P < 0,90$	INDEP.

CROISEMENT	TYPES D'ASQUES			POURCENTAGE DE RECOMBINAISON
	++	+l	ll	
A_20 x r ₁	2	78	60	29,2 ± 2,2
A_20 x j ₂	11	49	19	44,9 ± 3,4

TABLEAU 39 _

$ds_1 \times ds_2$	$ds_1 - ds_1 - ds_2 - ds_2$	$+ - ds_1 - ds_2 - ds_1 ds_2$	$+ - + - ds_1 ds_2 - ds_1 ds_2$	EGALITE DES TYPES EXTREMES $\chi^2_1 = 0,46$ $0,30 < P < 0,50$	LIAISON OU INDER.
	8	51	11		INDER.
$ds_1 \times ds_3$	$ds_1 - ds_1 - ds_3 - ds_3$	$+ - ds_1 - ds_3 - ds_1 ds_3$	$+ - + - ds_1 ds_3 - ds_1 ds_3$	EGALITE DES TYPES EXTREMES $\chi^2_1 = 1,38$ $0,20 < P < 0,30$	LIAISON OU INDER.
	10	43	16		INDER.
$ds_1 \times sps_1$	$sps_1 - sps_1 - ds_1 - ds_1$	$+ - sps_1 - ds_1 - sps_1 ds_1$	$+ - + - sps_1 ds_1 - sps_1 ds_1$	EGALITE DES TYPES EXTREMES $\chi^2_1 = 1,39$ $0,20 < P < 0,30$	LIAISON OU INDER.
	19	94	27		INDER.
$ds_1 \times sps_2$	ds_1	sps_2	$+$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.	CONCLUSION
	30	18	26	$\chi^2_1 = 0,04 ; 0,80 < P < 0,90$	INDEPENDANCE
$ds_1 \times sps_3$	ds_1	sps_3	$+$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.	CONCLUSION
	25	18	19	$\chi^2_1 = 0,19 ; 0,50 < P < 0,70$	INDEPENDANCE

TABLEAU 40_

$ds_1 \times spp_1$	ds_1	spp_1	+	$ds_1 spp_1$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.	CONCLUSION
	19	27	18	19	$\chi^2_1 = 0,97, 0,30 < P < 0,50$	INDEPENDANCE
$ds_1 \times as_1$	ds_1	as_1	+	$ds_1 as_1$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.	CONCLUSION
	50	46	37	51	$\chi^2_1 = 0,34, 0,50 < P < 0,70$	INDEPENDANCE
$ds_1 \times spa_1$	spa_1		+		ds_1 ET $ds_1 spa_1$ INDISTINGUABLES	TEST REPAR.1.1.2
	21		24		35	$\chi^2_2 = 1,47$ $0,30 < P < 0,50$
$ds_1 \times ir_1$	$ir_1 - ir_1 - ds_1 - ds_1$	$ir_1 - ds_1 - ir_1 ds_1$	$ir_1 - ds_1 - ir_1 ds_1$	$ir_1 ds_1$	$ir_1 ds_1$	CONCLUS.
	15		48		10	EGALITE DES TYPES EXTREMES $\chi^2_1 = 1,0$ $0,30 < P < 0,50$
$ds_2 \times ds_3$	ds_2	ds_3	+	$ds_2 ds_3$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.	CONCLUSION
	18	15	23	16	$\chi^2_1 = 0,50, 0,30 < P < 0,50$	INDEPENDANCE

TABLEAU 41 -

$ds_2 \times sps_1$	$sps_1 - sps_1 - ds_2 - ds_2$		$+ - sps_1 - ds_2 - sps_1 ds_2$		$+ - sps_1 ds_2 - sps_1 ds_2$		EGALITE DES TYPES EXTREMES	CONCLUS.
	14		69		6		$\chi^2 = 1,92$ $0,10 < P < 0,20$	INDER
$ds_2 \times sps_2$	ds_2	sps_2	+	$sps_2 ds_2$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.			CONCLUSION
	12	16	17	20	$\chi^2 = 0,01; 0,90 < P < 0,95$			INDEPENDANCE
$ds_2 \times sps_3$	ds_2	sps_3	+	$sps_3 ds_2$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.			CONCLUSION
	21	25	26	14	$\chi^2 = 0,41; 0,50 < P < 0,70$			INDEPENDANCE
$ds_2 \times spp_1$	spp_1	ds_2	+	$spp_1 ds_2$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.			CONCLUSION
	25	25	18	28	$\chi^2 = 0,16; 0,50 < P < 0,70$			INDEPENDANCE
$ds_2 \times as_1$	as_1	ds_2	+	$as_1 ds_2$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.			CONCLUSION
	19	13	18	23	$\chi^2 = 1,10; 0,20 < P < 0,30$			INDEPENDANCE

TABLEAU 42_

$ds_2 \times sp_{a_1}$		sp_{a_1}	+	ds_2 ET $ds_2 sp_{a_1}$ INDISTINGUABLES	TEST REPART.1.1.2 $\chi^2_2 = 1,08$ $0,50 < P < 0,70$	CONCLUS.
		18	22	48		INDEP.
$ds_2 \times ir_1$		$ds_2 - ds_2 - ir_1 - ir_1$	$+ - ds_2 - ir_1 - ds_2 ir_1$	$+ - ds_2 ir_1 - ds_2 ir_1$	EGALITE DES TYPES EXTREMES $\chi^2_1 = 1,31$ $0,20 < P < 0,30$	CONCLUS.
		12	63	7		INDEP.
$ds_3 \times sp_{s_1}$		$sps_1 - sp_{s_1} - ds_3 - ds_3$	$+ - sp_{s_1} - ds_3 - sp_{s_1} ds_3$	$+ - t - sp_{s_1} ds_3 - sp_{s_1} ds_3$	EGALITE DES TYPES EXTREMES $\chi^2_1 = 0,81$ $0,30 < P < 0,50$	CONCLUS.
		25	72	19		INDEP.
$ds_3 \times sp_{s_2}$		ds_3	sp_{s_2}	+	$ds_3 sp_{s_2}$	CONCLUSION
		10	11	13	10	INDEPENDANCE $\chi^2_1 = 0,09; 0,70 < P < 0,80$
$ds_3 \times sp_{s_3}$		ds_3	sp_{s_3}	+	$ds_3 sp_{s_3}$	CONCLUSION
		11	21	19	19	INDEPENDANCE $\chi^2_1 = 0,51; 0,30 < P < 0,50$

TABLEAU 43 -

$ds_3 \times spp_1$	spp_1	ds_3	$ds_3 spp_1$	+	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.	CONCLUSION
	21	29	21	25	$\chi^2_{1,1} = 0,16; 0,50 < P < 0,70$	INDEPENDANCE
$ds_3 \times as_1$	as_1	ds_3	+	$as_1 ds_3$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.	CONCLUSION
	21	25	18	27	$\chi^2_{1,1} = 0,01; 0,90 < P < 0,95$	INDEPENDANCE
$ds_3 \times spa_1$	spa_1		+	$ds_3 spa_1$	TEST REPART. 1,1,2	CONCLUS.
	25		27	47	$\chi^2_2 = 0,32$ $0,80 < P < 0,90$	INDEP.
$ds_3 \times ir_1$	$ds_3 - ds_3 - ir_1 - ir_1$	ir_1	$ir_1 - ds_3 - ir_1 - ds_3$	$ir_1 - ds_3 - ir_1 - ds_3$	EGALITE DES TYPES EXTREMES	CONCLUS.
	5		32	10	$\chi^2_1 = 1,66$ $0,10 < P < 0,20$	INDEP.
$sps_1 \times sps_2$	+	$sps_1 + sps_2 + sps_1 sps_2$	$sps_1 + sps_2 + sps_1 sps_2$	TEST REPART. 1-3	CONCLUSION	
	25	95	95	$\chi^2_{1,1} = 1,26; 0,20 < P < 0,30$	INDEPENDANCE	

TABLEAU 44 -

$sps_1 \times sps_3$	+	$sps_1 + sps_3 + sps_1 sps_3$ INDISTINGUABLES	TEST REPART. 1-3 $\chi^2_1 = 0,81; 0,30 < P < 0,50$	CONCLUSION
	14	55		INDEPENDANCE
$sps_1 \times spp_1$	$sps_1 - spp_1 - spp_1$	$t - sps_1 - spp_1 - sps_1 spp_1$	$t - t - sps_1 spp_1 - sps_1 spp_1$	EGALITE DES TYPES EXTREMES CONCLUS.
	21	36	2	DIFF. HAUT SIGNIFIC. LIAISON % = 33,8
$sps_1 \times as_1$	as_1	+	sps_1 ET $as_1 sps_1$ INDISTINGUABLES	TEST REPART. 1,1-2 CONCLUS.
	8	7	13	$\chi^2_2 = 0,35$ $0,80 < P < 0,90$ INDER.
$sps_1 \times spa_1$	spa_1	+	sps_1 ET $spa_1 sps_1$ INDISTINGUABLES	TEST REPART. 1,1-2 CONCLUS.
	31	26	45	$\chi^2_2 = 1,88$ $0,30 < P < 0,50$ INDER.
$sps_1 \times in_1$	$in_1 - in_1 - sps_1 - sps_1$	$t - in_1 - sps_1 - in_1 sps_1$	$t - t - in_1 sps_1 - in_1 sps_1$	EGALITE DES TYPES EXTREMES CONCLUS.
	19	65	18	$\chi^2_1 = 0,02$ $0,80 < P < 0,90$ INDER.

TABLEAU 45_

$\text{sps}_2 \times \text{sps}_3$	+		$\text{sps}_2 + \text{sps}_3 + \text{sps}_2 \text{sps}_3$ INDISTINGUABLES		TEST REPART. 1_3	CONCLUSION
	29		123		$\chi^2_{1,1} = 0,40; 0,50 < P < 0,70$	INDEPENDANCE
$\text{sps}_2 \times \text{spp}_1$	sps_2	spp_1	+	$\text{sps}_2 \text{spp}_1$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.	CONCLUSION
	25	13	25	16	$\chi^2_{1,1} = 0,05; 0,80 < P < 0,90$	INDEPENDANCE
$\text{sps}_2 \times \text{as}_1$	as_1		+		sps_2 ET $\text{as}_1 \text{sps}_2$ INDISTINGUABLES	TEST REPART.1.1.2
	11		9		29	$\chi^2_2 = 2,3$ $0,30 < P < 0,50$ CONCLUS. INDEP.
$\text{sps}_2 \times \text{spa}_1$	spa_1		+		sps_2 ET $\text{sps}_2 \text{spa}_1$ INDISTINGUABLES	TEST REPART.1.1.2
	24		20		35	$\chi^2_2 = 1,42$ $0,30 < P < 0,50$ CONCLUS. INDEP.
$\text{sps}_2 \times \text{ir}_1$	sps_2	ir_1	+	$\text{ir}_1 \text{sps}_2$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.	CONCLUSION
	14	26	24	12	$\chi^2_{1,1} = 0,21; 0,50 < P < 0,70$	INDEPENDANCE

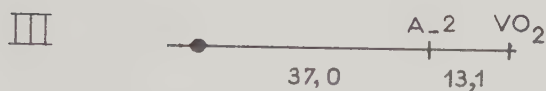
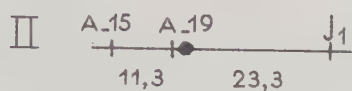
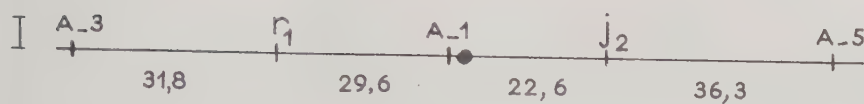
TABLEAU 46 _

$sps_3 \times spp_1$	+		$sps_3 + spp_1 + sps_3 spp_1$ INDISTINGUABLES		TEST REPART. 1-3 $\chi^2_1 = 0,30; 0,50 < P < 0,70$	CONCLUSION INDEPENDANCE
	15		38			
$sps_3 \times as_1$	as_1	sps_3	+	$as_1 sps_3$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB. $\chi^2_1 = 1,1; 0,20 < P < 0,30$	CONCLUSION INDEPENDANCE
	11	14	15	18		
$sps_3 \times spa_1$	spa_1		+		sps_3 ET $spa_1 sps_3$ INDISTINGUABLES 64	TEST REPART.1.1.2 $\chi^2_2 = 1,53$ $0,30 < P < 0,50$ CONCLUS. INDEP.
	41		35			
$sps_3 \times ir_1$	sps_3	ir_1	+	$sps_3 ir_1$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB. $\chi^2_1 = 32,1; P \ll 0,01$	CONCLUSION LIAISON - % = 18,5
	31	35	8	7		
$spp_1 \times as_1$	as_1	spp_1	+	$as_1 spp_1$	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB. $\chi^2_1 = 0,29; 0,50 < P < 0,70$	CONCLUSION INDEPENDANCE
	15	10	12	17		

TABLEAU 47 -

$spp_1 \times spa_1$	spp_1	spa_1	+	spp_1, spa_1	EGALITE DES TYPES PARENT. ET RECOMB.	CONCLUSION
	34	42	30	33	$\chi^2_{1,0,60;0,30} < P < 0,50$	INDEPENDANCE
$spp_1 \times ir_1$	spp_1	ir_1	+	spp_1, ir_1	EGALITE DES TYPES PARENT ET RECOMB.	CONCLUSION
	14	30	20	18	$\chi^2_{1,0,43;0,50} < P < 0,70$	INDEPENDANCE
$as_1 \times spa_1$	spa_1		+		as_1 ET as_1, spa_1 INDISTINGUABLES	TEST REPART.1.1.2
	25		22	55		$\chi^2_2 = 0,79$ $0,50 < P < 0,70$ INDER.
$as_1 \times ir_1$	as_1		+		ir_1 ET ir_1, as_1 INDISTINGUABLES	TEST REPART.1.1.2
	28		27	46		$\chi^2_2 = 0,81$ $0,50 < P < 0,70$ INDER.
$spa_1 \times ir_1$	spa_1		+		ir_1 ET ir_1, spa_1 INDISTINGUABLES	TEST REPART.1.1.2
	53		43	84		$\chi^2_2 = 1,90$ $0,30 < P < 0,50$ INDER.

TABLEAU 48 - GROUPES DE LIAISON MIS EN EVIDENCE CHEZ SORDARIA MACROSPORA
(DISTANCES CORRIGÉES A $t = 21-23^{\circ}C$)



CHAPITRE VI

PROBLÈMES DIVERS

Dans ce chapitre, nous envisagerons successivement les relations de dominance des gènes commandant la couleur de l'ascospore, l'origine de la paroi du périthèce, l'origine du bouquet d'asques, et enfin les rapports entre allèles au locus bl_1 .

1. — RELATIONS DE DOMINANCE DES GÈNES COMMANDANT LA COULEUR DE L'ASCOSPORE

Nous nous sommes limité à l'étude des gènes bl_1 , j_1 , j_2 , r_1 , r_2 , vo_1 , dont le mode d'action est autonome. Pour pouvoir établir si chacun de ces gènes est dominant ou récessif, il est indispensable d'obtenir des ascospores contenant un noyau mutant et un noyau de type sauvage. *A priori*, trois possibilités peuvent être envisagées :

- l'ascospore est noire : le gène mutant est récessif ;
- l'ascospore est de type mutant : le gène mutant est dominant ;
- l'ascospore est de teinte intermédiaire.

Nous sommes parvenu à résoudre ce problème en utilisant les propriétés de la souche ir_1 . Nous avons montré que les asques de ce mutant renferment huit noyaux au moment où les ascospores se délimitent. Cependant, le nombre de spores par asque varie entre une et huit, les spores plus grosses que la normale étant bi-, tri-, tétra-nucléées, etc...

Dans ces conditions, nous avons préparé les souches doubles mutantes suivantes : $ir_1 bl_1$; $ir_1 j_1$; $ir_1 j_2$; $ir_1 r_1$; $ir_1 ir_2$; $r_1 vo_1$. Chacune de ces souches a été croisée avec le mutant ir_1 à spores noires et les asques hybrides ont été examinés.

La planche 19 montre quelques-uns des types d'asques observés. Etant donné que chaque asque hybride contient quatre noyaux mutants et quatre noyaux de type sauvage, on voit que certaines spores (plus grosses que la normale) renferment un noyau sauvage et un noyau mutant. Or, ces ascospores sont noires. Ce résultat est valable pour les six mutants étudiés.

Dans quelques cas, une spore se trouve posséder deux noyaux mutants et un noyau sauvage. Ces spores sont également noires, ce qui indique

qu'une dose de l'allèle sauvage suffit à dominer complètement deux doses d'un gène mutant.

Nous savons qu'après la délimitation des ascospores chaque noyau subit une mitose supplémentaire ; une ascospore mûre normale possède donc deux noyaux.

Cette division a lieu également chez le mutant ir_1 , mais cela n'affecte nullement nos conclusions puisque le rapport des noyaux sauvages et mutants inclus dans une spore n'est pas modifié.

2. — ORIGINE DE LA PAROI DU PÉRITHÈCE

Il importe d'établir si, dans une confrontation entre souches génétiquement distinctes, la paroi des périthèces peut renfermer deux sortes de noyaux.

Pour cela, il est nécessaire de confronter deux souches dont les périthèces soient aisément identifiables par leurs caractères. La souche sauvage dont les périthèces sont noirs et la souche bl_1 dont les périthèces ont une paroi totalement dépourvue de pigment satisfont à cette condition.

Or, si l'on mélange en boîte de Pétri des hyphes des souches (+) et (bl_1), on constate qu'il se forme en périphérie des périthèces dont la paroi peut être soit blanche, soit noire, ou présenter des mosaïques de parties blanches et noires. Il est possible de faire une analyse génétique de la paroi : il suffit de prélever un fragment de col sur des périthèces individuels soigneusement décrits et numérotés. Le fragment donne naissance à des hyphes qui fructifient. On observe alors qu'une bonne proportion des cultures renferment à la fois des noyaux (bl_1) et des noyaux (+). C'est là une confirmation du fait que les parois en mosaïque renferment effectivement les deux sortes de noyaux.

On notera que la constitution génétique de la paroi d'un périthèce peut être quelconque par rapport aux asques qu'il renferme. Ainsi nous avons observé :

- Paroi blanche (bl_1), contenu hybride (+ et bl_1) ;
- Paroi noire (+), contenu secteur (+) et secteur hybride (+ et bl_1) ;
- Paroi mosaïque (+ et bl_1), contenu hybride (+ et bl_1) ;
- Paroi mosaïque (+ et bl_1), contenu blanc (bl_1) ;
- Paroi mosaïque (+ et bl_1), contenu noir (+) ;
- etc...

De même, la proportion des plages noires et blanches dans un périthèce en mosaïque est extrêmement variable.

3. — ORIGINE DU BOUQUET D'ASQUES

Jusqu'à présent, et dans un but de simplification, nous avons volontairement passé sous silence l'existence de périthèces mixtes dans les confrontations entre souches génétiquement distinctes.

En effet, si nous réalisons la confrontation entre les deux souches (+) et (bl_1), et si nous examinons individuellement le contenu des périthèces, nous trouvons cinq sortes de bouquets d'asques (Pl. 33) :

- (1) Comportant des asques à huit spores noires ;
- (2) Comportant des asques à huit spores blanches ;
- (3) Comportant des asques hybrides (4 spores noires + 4 spores blanches) ;
- (4) Comportant un secteur d'asques à huit spores noires et un secteur d'asques hybrides ;
- (5) Comportant un secteur d'asques à huit spores blanches et un secteur d'asques hybrides.

Aux types (4) et (5) nous donnons le nom de bouquets d'asques mixtes. Il est à noter qu'on ne rencontre jamais de bouquets comportant simultanément des asques à huit spores blanches et des asques à huit spores noires.

Nous avons cherché à élucider la nature de ces bouquets mixtes. Si l'on admet, par analogie avec *Neurospora*, qu'il n'y a que deux noyaux à l'origine d'un bouquet d'asques, on doit s'attendre à ce que, dans le croisement $A \times B$, les proportions des différents bouquets soient données par :

$$(A + B)^2 = A^2 + 2 AB + B^2$$

à condition, bien entendu, que les apports des deux souches aient été égaux et que le mélange des hyphes ait été complet. Ainsi, la proportion des bouquets d'asques hybrides (AB) doit être d'environ 50 %. Cependant, on ne peut expliquer de cette façon la production de bouquets mixtes.

Si l'on admettait qu'il y a trois noyaux à l'origine de chaque bouquet, les proportions devraient être :

$$(A + B)^3 = AAA + 3 A AB + 3 AB B + BBB$$

On obtiendrait cette fois uniquement des bouquets mixtes, dans la proportion des 3/4, en dehors des deux types parentaux.

Enfin, en supposant qu'il y a quatre noyaux à l'origine de chaque bouquet, les proportions doivent être :

$$(A + B)^4 = AAAA + 4 AA AB + 6 AB AB + 4 AB BB + BBBB$$

On obtient donc à la fois des bouquets hybrides simples et des bouquets mixtes, avec une fréquence globale de 7/8.

Pour tenter de préciser le nombre de noyaux qui interviennent effectivement à l'origine d'un bouquet d'asques, il est donc indispensable d'établir quelles sont les fréquences des différentes sortes de bouquets. Pour cela, nous avons utilisé les deux souches (+) et (bl_1). Nous les avons confrontées et nous avons ainsi obtenu des bouquets hybrides contenant au total moitié de spores (+) et moitié de spores (bl_1). Ce sont ces bouquets que nous avons

repiqués en bloc et dont nous avons étudié la descendance. On assure ainsi au départ un apport identique pour les deux souches et un mélange complet des deux types de noyaux.

Le tableau 49 donne les résultats obtenus pour cinq cultures distinctes. Dans chaque cas, on constate que les proportions des deux types parentaux sont rarement égales, malgré les précautions prises. Tantôt l'un des types prédomine, tantôt l'autre ; aucun procédé ne nous a permis d'éliminer cette fluctuation.

TABLEAU 49_

ANALYSE INDIVIDUELLE DES PERITHECES ISSUS
DE LA CONFRONTATION $+ \times bl_1$:

BOUQUETS D'ASQUES CULTURE No.	PARENTAUX A SPORES BLANCHES	PARENTAUX A SPORES NOIRES	HYBRIDES PURS	MIXTES A SECTEUR NOIR	MIXTES A SECTEUR BLANC
1	39	7	23	8	9
2	39	1	25	2	8
3	30	6	38	5	10
4	4	17	14	12	6
5	19	16	15	4	2
SOMME	131	47	115	31	38
	178		186		

Il nous semble cependant légitime d'additionner ces résultats hétérogènes pour nous faire une idée globale des fréquences. On constate (tableau 49) que le nombre de bouquets d'asques parentaux est de 178 et celui des bouquets mixtes ou hybrides de 186. Les effectifs de ces deux classes sont donc à peu près égaux. On ne peut appliquer le critérium χ^2 , en raison des différences considérables entre les expériences 1 à 5. Toutefois, il semble vraisemblable que si les périthèces examinés avaient été beaucoup plus nombreux, les deux classes auraient été pratiquement égales. (Une situation analogue, à certains points de vue, se rencontre dans les « croisements » de bactériophages : le pourcentage de types recombinants montre des fluctuations énormes si l'on compare les lyses bactériennes individuelles ; au total,

cependant, les fréquences des deux types recombinants sont égales et fixes.)

Compte tenu de ce que nous avons exposé plus haut, ceci élimine la possibilité qu'il puisse y avoir trois ou quatre noyaux (et *a priori* davantage) à l'origine d'un bouquet d'asques.

Il nous semble donc légitime de conclure *qu'il n'y a que deux noyaux au départ*. Un bouquet hybride ou mixte dériverait d'un dicaryon AB. Ce n'est que secondairement que pourraient s'isoler, dans les hyphes ascogènes, un secteur contenant A et B et un secteur contenant seulement A (ou B). A ce propos, il est utile de rappeler que, dans les bouquets mixtes, les deux types d'asques ne sont jamais mélangés, mais constituent effectivement deux secteurs contigus. La séparation doit donc s'effectuer dès le début des mitoses conjuguées dans les hyphes ascogènes.

Nous avons pu apporter de nouvelles confirmations statistiques à notre hypothèse, en réalisant des confrontations triples et quadruples, mettant en jeu simultanément trois (A + B + C) ou quatre souches (A + B + C + D). Dans le premier cas, les bouquets d'asques des types parentaux doivent représenter 1/3 du total. Dans le deuxième cas, ces mêmes bouquets doivent constituer 1/4 du total.

Pour réaliser des confrontations triples, nous avons choisi soit les souches (+), (bl₁) et (r₂), soit les souches (+), (bl₁) et (vo₁). En effet, les trois types parentaux, les trois types hybrides et les six types mixtes sont immédiatement identifiables par simple examen microscopique. Le tableau 48 donne les résultats obtenus. On constate que, dans un pourcentage faible de cas, le bouquet d'asques a trois noyaux à son origine. Nous avons même rencontré un bouquet comportant quarante asques (r₃) et trois asques (+). Cependant, si nous totalisons tous les chiffres, nous obtenons les fréquences globales suivantes :

Bouquets d'asques parentaux	Bouquets d'asques hybrides purs	Bouquets d'asques mixtes
457	655	267
Total = 1.379		

Nous avons vu que dans le cas où il y a deux noyaux à l'origine de chaque bouquet d'asques, le pourcentage des bouquets parentaux est de 1/3. Ici, la fréquence théorique est donc de 459. Cette fréquence est extrêmement voisine de celle que l'on observe (457).

Nous sommes donc en droit de conclure que, mis à part quelques rares anomalies, il n'y a que deux noyaux à l'origine de chaque bouquet d'asques.

Pour réaliser des confrontations quadruples, nous avons choisi les souches (+), (bl₁), (r₂), (vo₁). Le tableau 50 indique les résultats obtenus. Il

existe quatre types hybrides purs et douze types mixtes si chaque bouquet d'asques dérive de deux noyaux. La fréquence des types parentaux doit être de 1/4, donc ici de 65. Le chiffre observé (56) n'en diffère pas énormément. Il en résulte que notre hypothèse reçoit une confirmation supplémentaire.

EXAMEN CYTOLOGIQUE DU PROBLÈME

Il serait intéressant de s'assurer, par une étude cytologique, qu'il n'y a que deux noyaux à l'origine d'un bouquet d'asques.

L'origine du périthèce chez *S. fimicola* a fait l'objet des recherches de GILKINET (65), DANGEARD (26, 27), SATINA (150), PIEHL (121), PAGE (118), GREIS (68), RITCHIE (135), GAÜMANN (64), CL. MOREAU (110). Or, il est intéressant de noter que cette espèce forme aussi des bouquets d'asques mixtes, comme cela a été établi par OLIVE (117) et confirmé par Mme CHAVASSE-FRÉTAZ (non publié).

L'espèce *S. macrospora* a été étudiée par DENGLER (29) et par CL. MOREAU (110). Enfin *S. papyricola* a été examiné par DANGEARD (26, 27) sous le nom inexact de *S. macrospora*, et par CL. MOREAU (110).

En ce qui concerne *S. fimicola*, DANGEARD (26, 27) et GILKINET (65) ont observé un ascogone enroulé en spirale et des filaments recouvrants (deux ou trois) partant de la base de l'ascogone ou d'un rameau voisin. Plus tard, l'ascogone se cloisonne en trois ou quatre articles plurinucléés. DANGEARD n'a pas vu d'échange de noyau entre l'ascogone et les filaments recouvrants. Ces derniers sont à l'origine de la paroi du périthèce. L'ascogone bourgeonne en donnant des hyphes ascogènes qui produisent des asques par le mécanisme du crochet.

PIEHL (121), GREIS (68) ont décrit une fusion entre l'ascogone et un hyphe qui vient le recouvrir (anthéridie). Ce dernier auteur a signalé que les ascogones et les anthéridies étaient plurinucléés. Ces éléments fusionnent et un noyau passe de l'anthéridie dans l'ascogone. Toutefois, GREIS ne donne aucune précision sur le nombre de noyaux présents dans l'ascogone avant et après fécondation.

RITCHIE (135) signale que, parmi les cellules de l'ascogone, certaines sont uninucléées, la majorité binucléées et quelques-unes ont trois noyaux.

CL. MOREAU (110) a étudié le mode de formation du périthèce chez *S. fimicola*. Il confirme la description des précédents auteurs, mais il n'a pas cherché à voir les noyaux.

En ce qui concerne *S. macrospora*, DENGLER (29) a signalé l'existence d'ascogones qui copulent avec des hyphes végétatifs. CL. MOREAU (110) a confirmé la présence d'ascogones cloisonnés, enroulés en spirale, souvent recouverts par des filaments qui prennent naissance à la base de l'ascogone et proviennent d'autres hyphes.

Ainsi, pour les deux espèces *S. fimicola* et *S. macrospora* ayant fait l'objet

d'une analyse génétique, il est clair que les études cytologiques qui ont été réalisées sur la formation du périthèce ne permettent pas de savoir s'il y a deux noyaux seulement à l'origine du bouquet d'asques.

Dans la plupart des recherches que nous venons de signaler, la méthode des coupes à la paraffine a été employée. Cette technique est probablement inapte à résoudre le problème qui nous préoccupe. C'est pourquoi nous avons jugé inutile, pour notre part, d'ajouter un travail non concluant à ceux déjà réalisés dans le passé.

Par contre, nous avons été frappé par le procédé intéressant mis au point par MC GAHEN et WHEELER (1966) pour l'étude de la formation du périthèce chez *Glomerella*. Ces auteurs réalisent des cultures sur lamelles en goutte pendante, dans une chambre humide. Ils suivent sous le microscope la croissance des hyphes et la formation des périthèces. Au moment opportun, le matériel peut être fixé et coloré par du carmin propionique.

Dans cette espèce, le périthèce a pour origine deux diverticules latéraux d'un hyphe unique. Ces diverticules s'enroulent l'un autour de l'autre en formant deux tortillons de cellules uninucléées, l'un interne, l'autre externe. Ce dernier donne naissance à la paroi du périthèce. Le tortillon interne est à l'origine des hyphes ascogènes. A ce moment, un hyphe vient s'appliquer contre la cellule terminale du tortillon ascogonial et un noyau passe dans cette cellule qui devient ainsi binucléée. Elle prolifère dès le début par le procédé du crochet et est à l'origine de tout le bouquet d'asques.

WHEELER, OLIVE, ERNEST, EDGERTON (1964) ont utilisé la même méthode pour l'étude de la formation des asques chez *Glomerella*. Ils ont confirmé qu'en général l'une au moins des cellules du tortillon ascogonial est binucléée, les autres étant uninucléées. Très rarement, on trouve des cellules ascogoniales contenant trois ou quatre noyaux.

Il ne fait pas de doute que, chez *Glomerella*, il n'y a généralement que deux noyaux à l'origine du bouquet d'asques.

Nous avons cherché à appliquer à *Sordaria macrospora* la méthode de MC GAHEN et WHEELER. Cependant, en goutte pendante (de milieu de Dodge), placée en chambre humide, les hyphes ne poussent qu'avec lenteur et aucune formation de périthèces n'a lieu. Dans ces conditions, nous n'avons pas réussi à contrôler cytologiquement les déductions auxquelles nous sommes parvenu par l'analyse génétique, à savoir que chaque bouquet d'asque est issu (en général) d'un unique dicaryon.

4. — RAPPORTS ENTRE LES ALLÈLES bl_1 , bv , be_1 , be_2

Rappelons que les mutants bl_1 , bv , et be_1 ont été obtenus par traitement aux rayons X et le mutant be_2 sous l'action de l'allylthiosemicarbazide.

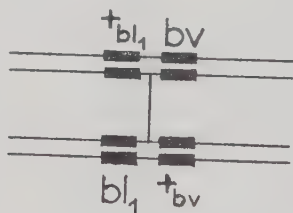
Nous avons cherché à établir s'il s'agissait d'allèles vrais ou de pseudo-allèles, au sens donné à ce terme par E. B. LEWIS. Dans une première expé-

rience, nous avons confronté les deux souches bl_1 et bv et nous avons constaté qu'il apparaît, avec une très faible fréquence, des ascospores noires. A priori, on ne peut dire dans quel type d'asque (parental ou hybride) ces spores se rencontrent. En effet, les ascospores bl_1 et bv ont une coloration très voisine, et les asques hybrides ne montrent pas de ségrégation évidente à l'examen microscopique. Nous avons préparé les deux souches $bv ds_2$ (spores blanc-verdâtre en désordre) et $bl_1 ir_1$ (spores blanches irrégulières). La confrontation de ces deux souches permet d'identifier sans ambiguïté les asques hybrides dont les spores sont régulières et linéairement disposées.

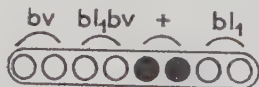
Dans ces conditions, nous avons établi que les spores noires ne se rencontrent que dans les asques hybrides, et jamais dans ceux des deux types parentaux bl_1 et bv . Ce fait élimine donc la possibilité qu'il puisse s'agir de mutations réverses ($bl_1 \longrightarrow +$ ou $bv \longrightarrow +$), à moins d'admettre que la présence simultanée des deux allèles bl_1 et bv dans un même asque augmente ces fréquences. Nous verrons bientôt qu'un tel phénomène est hautement improbable.

L'explication la plus simple est de supposer que bl_1 et bv sont des pseudo-allèles, un crossing-over pouvant se produire occasionnellement à l'intérieur de ce locus, donnant ainsi naissance à des spores noires.

Schématiquement nous avons :

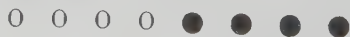


Si un tel événement a lieu on obtient un asque du type :



comportant par conséquent deux spores noires. Par contre, un tel mécanisme ne peut expliquer la production d'asques contenant quatre spores noires (il faudrait supposer qu'il s'est produit un crossing-over double à l'intérieur du locus, ce qui est tout à fait invraisemblable).

Or, sur 60.000 asques hybrides examinés, nous en avons trouvé 23 qui contenaient deux spores noires, et un qui en renfermait quatre ainsi disposées :



Nous avons réussi à faire germer les spores noires extraites de certains de ces asques. Elles donnent naissance à des cultures identiques au type sauvage. Cependant, nous ne sommes jamais parvenu à obtenir la germination totale des quatre groupes de spores contenus dans ces asques. Ceci peut tenir au fait que les ascospores bl_1 et bv ont une paroi mince et fragile, mais peut aussi s'expliquer par l'avortement d'une partie des spores qui sont génétiquement incapables de germer.

Ainsi donc, l'étude du croisement ($bl_1 \times bv$) nous conduit à la conclusion que ces deux gènes ne sont pas de véritables pseudo-allèles. Le type bv — qui n'a été isolé qu'une seule fois — serait porteur d'un remaniement chromosomique de faible amplitude (petite inversion ou duplication) associé au gène bl_1 .

Cette hypothèse a été confirmée par l'étude des cinq autres croisements possibles entre les quatre souches bl_1 , bv , be_1 , be_2 . En effet, les confrontations ($bl_1 \times be_1$), ($bl_1 \times be_2$), ($be_1 \times be_2$) ne conduisent à la formation d'aucune ascospore noire. Par contre, les confrontations ($bv \times be_1$) et ($bv \times be_2$) en donnent. Mais ici on voit nettement que tout asque contenant des spores noires renferme aussi des spores avortées.

Ainsi, les trois gènes bl_1 , be_1 , be_2 peuvent être considérés comme des allèles vrais. Par opposition, la souche bv est certainement porteuse du gène bl_1 associé à un petit remaniement chromosomique. La modification de teinte des ascospores (blanc-verdâtre) ne serait alors qu'un effet de position.

Il est utile de remarquer que seul l'examen individuel des produits de chaque méiose a permis de détecter des avortements de spores et d'établir que la souche bv portait un remaniement chromosomique. Une étude globale aurait amené à conclure que bl_1 et bv étaient de véritables pseudo-allèles.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Au terme de cette étude, il convient de rappeler les résultats essentiels auxquels nous sommes parvenu.

1. — Nous avons étudié le déroulement de la méiose chez 12 espèces ou variétés d'Ascomycètes coprophiles appartenant aux genres *Sordaria* et *Pleurage*, à savoir :

- 1) *S. macrospora* Auersw.
- 2) *S. fimicola* (Rob.) Ces. et de Not.
- 3) *Pl. decipiens* (Wint.) Kze. f. 8 spores.
- 4) *Pl. decipiens* (Wint.) Kze. f. 16 spores.
- 5) *Pl. curvula* (de By.) Kze.
- 6) *Pl. curvula* var. *coronifera* (Grove) nov. comb.
- 7) *Pl. fimiseda* (Ces. et de Not.) Griffiths.
- 8) *Pl. setosa* (Wint.) Kze.
- 9) *Pl. minuta* (Fck.) Kze. f. 4 spores.
- 10) *Pl. minuta* (Fck.) Kze. f. 8 spores.
- 11) *Pl. anserina* (Ces.) Kze.
- 12) *Pl. zygospora* (Spegazzini) Kze.

Chez toutes ces espèces, sans exception, nous avons constaté que l'asque prend naissance par le mécanisme du crochet dangeardien. La première mitose subie par le noyau diploïde du jeune asque est réductionnelle. Il n'y a pas d'autre diminution du nombre de chromosomes. Par conséquent, n'existe pas de brachyméiose au sens de GWYNNE-VAUGHAN.

Nous avons partout mis en évidence l'existence d'un centrosome en forme de bâtonnet. Feulgen-négatif, se divisant dans les interphases. A ce stade, les centromères de chaque chromosome sont étroitement accolés contre le centrosome et, à partir de ce point, les bras divergent. Le centrosome joue un rôle actif dans la formation du fuseau, la délimitation et la polarité des ascospores.

Chez les *Sordaria*, l'asque renferme, en télophase III, 8 noyaux, dont chacun possède son centrosome. Ces derniers délimitent ensuite 8 ascospores uninucléées. Une mitose supplémentaire intervient alors. La spore mûre est donc binucléée.

Chez les *Pleurage*, les faits sont du même ordre pour les espèces dont les asques contiennent 8 ou 16 ascospores. Cependant, l'un des 2 noyaux issus de la dernière mitose émigre dans le futur appendice primaire, qui s'isole par une cloison de la spore proprement dite, puis dégénère.

Chez *Pl. anserina* et *Pl. minuta* f. 4 spores, l'asque renferme aussi 8 noyaux et 8 centrosomes en télophase III, mais ces derniers se groupent en 4 paires. Les centrosomes appariés coopèrent pour délimiter 4 ascospores qui incluent 2 noyaux non frères. Ceux-ci subissent ensuite 1 mitose et des 4 noyaux formés, l'un émigre dans l'appendice primaire.

Le nombre des chromosomes est égal, suivant les espèces, à $n=6$ ou $n=7$. L'un est attaché au nucléole.

2. — Sous l'action des rayons X, nous avons obtenu, chez *Sordaria macrospora*, 3 mutants géniques chez qui le déroulement de la méiose et le mécanisme de délimitation des ascospores sont fortement perturbés. Nous avons pu réaliser ainsi une étude expérimentale des fonctions du centrosome.

a) Chez le mutant ir_1 , les asques renferment un nombre très varié d'ascospores, en fait de 1 à 8. L'étude de la méiose chez ce mutant indique qu'en télophase III, les noyaux et leurs centrosomes sont inégalement répartis dans l'asque. On conçoit dès lors qu'au moment où les divers centrosomes délimitent chacun une masse de cytoplasme, ébauche de la future ascospore, la proximité de certains centrosomes se traduise par la formation d'une masse commune de cytoplasme qui, dans ce cas, englobe 2, 3, 4... noyaux.

b) Chez le mutant sps_1 , les asques renferment en général plus de 8 spores. Beaucoup de ces ascospores avortent et restent hyalines, au lieu de se colorer en noir intense comme les spores normales viables.

L'étude de l'évolution de l'asque révèle qu'il prend naissance par le mécanisme du crochet. Mais cet asque demeure binucléé. La fusion des deux noyaux haploïdes qu'il contient au départ n'ayant pas lieu.

Au stade où l'asque renferme 8 noyaux, on constate que les 8 centrosomes exécutent une division supplémentaire. L'asque contient alors 8 noyaux et 16 centrosomes.

C'est ensuite que se produit la délimitation des ascospores sous l'action des centrosomes. Etant donné qu'il y a 16 centrosomes pour 8 noyaux, on s'explique qu'il se forme en général plus de 8 spores. Les spores supplémentaires sont anucléées.

La preuve essentielle que l'étude cytologique du mutant sps_1 nous apporte est que la délimitation des ascospores est induite par le centrosome.

c) Chez le mutant génique as_1 , les asques renferment à la fois des spores avortées et des spores viables. Ces dernières sont nettement plus grosses que les ascospores normales.

En prophase I, les 14 chromosomes du noyau diploïde restent à l'état d'univalents. Ultérieurement, certains centrosomes semblent perdre con-

tact avec le noyau, et on les retrouve isolés dans le cytoplasme à une distance des chromosomes qui est parfois considérable.

Corrélativement, certains groupes de chromosomes ont perdu leurs centrosomes. On constate que ces chromosomes sont incapables d'entrer en anaphase.

Quand le nombre total de centrosomes atteint 8, la délimitation des ascospores a lieu. On observe à la fois des ascospores nucléées et anucléées.

De l'étude de ce mutant, il semble donc que nous puissions conclure que le centrosome (peut-être en coopération avec les centromères des divers chromosomes) est l'organisateur du fuseau car, en son absence, tout mouvement anaphasique est supprimé.

3. — Parmi les douze espèces de *Sordaria* et *Pleurage* que nous venons de mentionner, nous avons choisi comme objet d'étude génétique détaillée *Sordaria macrospora* Auersw. Ce choix a été fait pour les raisons suivantes :

a) Le cycle de développement de ce champignon est très court : 8 jours à 29° C.

b) On peut le cultiver facilement sur un milieu simple (milieu de Dodge).

c) Les ascospores sont disposées linéairement dans l'asque et suffisamment grosses pour pouvoir être extraites dans leur ordre, avec une aiguille fine.

d) Le caractère homothallique de cette espèce, qui en fait un matériel particulièrement favorable à l'obtention de mutations sous l'action des radiations et des substances mutagènes.

Cette espèce n'avait jusqu'à présent fait l'objet que d'études génétiques rudimentaires.

4. — Sous l'action des rayons X, nous avons obtenu, chez *Sordaria macrospora*, 81 mutants géniques distincts, que l'on peut classer en 5 groupes :

a) Mutations affectant la couleur des ascospores : le type sauvage de *S. macrospora* possède des ascospores noires, mais nous avons obtenu 58 mutants où ce caractère est modifié et qui ont, suivant les cas, des spores blanches, jaunes, roses, vertes, violettes, beiges. Au total, neuf loci distincts ont été identifiés : bl_1 , j_1 , j_2 , r_1 , r_2 , vo_1 , vo_2 , v_1 , bf .

b) Mutations affectant la disposition des ascospores dans l'asque : 5 mutants dont les ascospores sont en désordre, ou disposées sur deux rangs, ont été obtenus. 4 loci distincts sont en cause : ds_1 , ds_2 , ds_3 , ds_4 .

On notera que ce caractère, dont l'importance systématique n'a pas besoin d'être soulignée, a un déterminisme génétique simple.

c) Mutations affectant la taille et les formes des ascospores : alors que le type sauvage de *S. macrospora* a des ascospores ovoïdes dont la longueur

moyenne est de $21,2 \mu$, nous avons isolé 2 mutants distincts dont les spores sont rondes et beaucoup plus petites — (diamètres respectifs : $16,8 \mu$ et $18,8 \mu$).

Un autre mutant (sps_1) a des spores nettement plus allongées (longueur moyenne : $23,9 \mu$) que le type sauvage. Elles rappellent par leur forme celles de l'espèce voisine *S. fimicola*.

Ces 3 mutants présentent un intérêt certain en raison de l'importance systématique des caractères qu'un simple gène est ici capable de modifier.

Trois loci sont en cause : spp_1 , spp_2 , spa_1 .

d) Mutations affectant le nombre et la taille des ascospores dans ce groupe, 13 mutants ont été isolés ; certains ont déjà été mentionnés précédemment, car ils ont permis de préciser les fonctions du centrosome : ir_1 , sps_1 , as_1 .

Au total, 8 loci distincts ont été identifiés : gi_1 , ir_1 , sps_1 , sps_2 , sps_3 , as_1 , an_1 , an_2 .

e) Mutations affectant la croissance et la morphologie du mycélium : nous avons obtenu 2 mutants de cette catégorie. 2 loci distincts sont en cause : cl_1 , cl_2 .

5. — En ce qui concerne le comportement des souches mutantes que nous venons de mentionner, nous avons établi que la plupart des gènes commandant la couleur de l'ascospore ont un comportement autonome (tel est le cas de bl_1 , j_1 , j_2 , r_1 , r_2 , vo_1 , vo_2 , v_1 ; par contre, le gène bf est non autonome).

Tous les mutants des groupes (b), (c) et (d) ont au contraire en commun une remarquable absence d'autonomie. En effet, lorsque ces mutants sont croisés avec le type sauvage, les asques hybrides obtenus sont absolument identiques à ceux de la race sauvage. Par voie de conséquence, la confrontation de ces mutants deux à deux conduit aussi à des asques hybrides de type sauvage. Nous considérons que ce phénomène résulte de ce que le caractère d'un asque apparaît commandé par la constitution génétique des deux noyaux de la cellule ascogène (les gènes étant supposés récessifs).

6. — Dans le cours de nos recherches sur l'action génétique des rayons X, nous avons rencontré un très grand nombre de remaniements chromosomiques. Ceux-ci se traduisent invariablement par la production de spores avortées. La théorie générale que nous avons développée dans le cas de la translocation réciproque et des inversions para- et péricentrique est en bon accord avec les faits observés.

L'étude quantitative du phénomène a révélé que l'état des hyphes au moment de l'irradiation (en croissance active ou au repos) a une grande influence. En outre, le pourcentage de bouquets d'asques en disjonction (avec spores avortées) est maximum pour une certaine dose et diminue ensuite.

7. — Nous avons étudié 55 substances de façon à établir si certaines d'entre elles avaient des propriétés mutagènes. Les groupes chimiques ainsi prospectés sont :

- a) L'acridine et certains dérivés substitués.
- b) Des substances apparentées à l'acridine ou résultant d'une simplification de sa molécule.
- c) Des dérivés de la thiourée.
- d) Des phénylcarbammates.

Quatre corps ont montré des propriétés mutagènes intéressantes : l'acridine, l'euflavine, l'allylthiosemicarbazide, l'allylsénévol.

Les deux derniers corps sont susceptibles d'induire des mutations géniques et des remaniements chromosomiques. La proportion relative de ces deux types de mutations est très différente de ce que l'on obtient avec les rayons X.

8. — L'acridine, incorporée au milieu de culture à la concentration de 3 mg pour 100 cm³, ralentit considérablement la croissance du mycélium, qui finit par mourir dans un délai d'une quinzaine de jours après le début de l'expérience. Toutefois, il se développe en divers points des colonies mycéliennes de taille et d'aspect très variés.

Si l'on effectue des prélèvements dans ces colonies et que l'on transfère le mycélium en milieu normal sans acridine, on obtient des souches dont la vitesse de croissance, lente ou très lente, est très inférieure à celle du type sauvage initial.

20 variants distincts (A-1, ... A-20) ont été isolés de cette façon. Ils conservent leurs caractères au cours des repiquages successifs, et nous avons établi qu'il s'agissait, sans exception, de mutations géniques simples. Ces souches à croissance lente sont des mutants de résistance à l'acridine. Nous avons établi que ce dernier corps a une action mutagène générale. Toutefois, dans les conditions de l'expérience, l'acridine effectue une sélection parmi les mutants qu'elle induit.

L'étude génétique des 20 variants a révélé que 11 loci distincts étaient en cause. L'un des loci a muté 9 fois, ce qui semble indiquer, soit une mutabilité particulièrement élevée, soit une action semi-spécifique de l'acridine sur ce locus.

Nous avons recherché si la croissance lente des souches précédentes résultait d'une modification du système des cytochromes. Trois méthodes distinctes (Mesure de la respiration par la technique de Warburg en absence et en présence d'azide de sodium, étude du spectre des cytochromes, réaction de Nadi) ont permis d'établir que les mutants obtenus sous l'action de l'acridine ont un système normal de cytochromes.

Nous avons confronté deux à deux un mutant représentatif de chacun des onze loci identifiés, soit 55 combinaisons. Dans la plupart de ces combinai-

sons, un mycélium hétérocaryotique de type sauvage se dégage du mélange et envahit rapidement toute la boîte de Pétri. Cependant, dans 11 confrontations, un mycélium de type sauvage n'a jamais pu être obtenu.

Ces faits méritent d'être soumis ultérieurement à un examen détaillé.

9. — L'euflavine, incorporée au milieu de culture à la concentration de 1 pour 2.000, entraîne une croissance anormale des hyphes. Des prélèvements de mycélium, effectués au cours des premières 24 heures, conduisent à des cultures stériles.

Le mycélium ainsi modifié a une croissance extrêmement irrégulière et montre une sénescence rapide, certains hyphes s'arrêtant de croître définitivement après avoir parcouru un tracé ondulant.

Si l'on croise une culture stérile de cette sorte avec une souche normale, on obtient aisément des asques hybrides dont on peut repiquer isolément les ascospores. Toutes donnent naissance à des cultures parfaitement fertiles. Il en résulte que le caractère de stérilité induit par l'euflavine a une hérédité cytoplasmique.

10. — Pour les gènes autonomes gouvernant la couleur de l'ascospore et un certain nombre d'autres gènes, nous avons mesuré le pourcentage de post-réduction (et déterminé ainsi la distance au centromère).

Dans certains cas, nous avons trouvé des valeurs significativement supérieures à la limite théorique de 66,7 %.

Pour les gènes commandant la couleur de l'ascospore, les mesures ont été faites à 3°, 9°, 12°5, 17°5, 21° et 27°. Nous avons constaté que la température a une action très marquée sur le crossing-over. Toutefois, selon les gènes considérés, une augmentation de température peut se traduire par un accroissement ou par une réduction du pourcentage de post-réduction.

11. — Nous avons déterminé les relations mutuelles des loci identifiés, en choisissant comme système de référence les 8 gènes autonomes gouvernant la couleur de l'ascospore. De cette façon nous avons établi l'existence de 6 groupes de liaisons, alors que *Sordaria macrospora* possède 7 chromosomes. Ces groupes contiennent les gènes suivants :

Groupe I : r_1 ; j_2 ; A-1 ; A-3 ; A-5 ; A-10 ; A-16 ; A-17.

Groupe II : j ; A-7 ; A-15 ; A-19.

Groupe III : vo_2 ; A-2.

Groupe IV : v_1 ; r_2 .

Groupe V : vo_1 .

Groupe VI : bl_1 .

12. — Nous nous sommes demandé si le centrosome, que nous avons vu se diviser au cours de chaque interphase dans l'asque, a, sous son contrôle

direct, certains caractères héréditaires. Si tel est le cas, les caractères en cause doivent concerner le fuseau et la délimitation des ascospores, à savoir : la direction des fuseaux, la taille, la forme et le nombre des ascospores.

Parmi les mutants dont nous disposons, nous avons choisi les 10 suivants : ds_1 ; ds_2 ; ds_3 ; sps_1 ; sps_2 ; sps_3 ; spp_1 ; as_1 ; spa_1 ; ir_1 . En supposant que ces 10 mutants soient tous localisés sur le centrosome (et non sur les chromosomes), ils doivent constituer un unique groupe de liaison.

C'est pourquoi nous avons confronté deux à deux les 10 souches précédentes. Deux liaisons seulement ont été établies, à savoir :

- entre sps_1 et spp_1
- entre sps_3 et ir_1

Les 6 autres gènes semblent mutuellement indépendants.

Il semble donc légitime de conclure que les 10 gènes considérés ne font pas partie d'un unique groupe de liaison. Leur comportement suggère qu'ils sont répartis sur les 7 chromosomes de *S. macrospora*. Ainsi, il n'y a pas de raison de supposer que le centrosome est le support de caractères héréditaires.

13. — En utilisant les propriétés de la souche ir_1 (spores irrégulières), nous avons réussi à établir que les 8 gènes autonomes gouvernant la couleur de l'ascospore sont récessifs. Une dose de l'allèle sauvage suffit encore à dominer 2 doses d'un gène mutant.

14. — Dans les confrontations entre souches génétiquement distinctes, on rencontre fréquemment des périthèces dont la paroi est une mosaïque et contient deux sortes de noyaux.

15. — Dans tout croisement, on trouve des bouquets d'asques hybrides purs et des bouquets mixtes comportant un secteur hybride et un secteur parental.

Nous avons montré qu'il s'agit là d'un phénomène secondaire. Dans le cas général, il n'y a que 2 noyaux à l'origine de tout bouquet d'asques.

16. — L'étude des 4 allèles bl_1 , bv , be_1 , be_2 , révèle que bl_1 , be_1 , be_2 sont des allèles vrais, mais que la souche bv est porteuse d'un remaniement chromosomique de faible amplitude qui pourrait faire croire, au premier examen, que bl_1 et bv sont des pseudo-allèles.

SUMMARY

1. — Meiosis has been studied in twelve species or varieties of coprophilous Ascomycetes belonging to the genera *Sordaria* and *Pleurage*, namely :

- 1) *S. macrospora* Auersw.
- 2) *S. fimicola* (Rob.) Ces. et de Not.
- 3) *Pl. decipiens* (Wint.) Kze. f. 8 spores.
- 4) *Pl. decipiens* (Wint.) Kze. f. 16 spores.
- 5) *Pl. curvula* (de By.) Kze.
- 6) *Pl. curvula* var. *coronifera* (Grove) nov. comb.
- 7) *Pl. fimiseda* (Ces. et de Not.) Griffiths.
- 8) *Pl. setosa* (Wint.) Kze.
- 9) *Pl. minuta* (Fck.) Kze. f. 4 spores.
- 10) *Pl. minuta* (Fck.) Kze. f. 8 spores.
- 11) *Pl. anserina* (Ces.) Kze.
- 12) *Pl. zygospora* (Spegazzini) Kze.

In all these species, without exception, the ascus has been seen to arise through the classical crozier mechanism. The first mitoses undergone by the diploid nucleus of the young ascus is a reductional one. No other chromosome number reduction is taking place; therefore there is no brachymeiosis, as understood by Gwynne-Vaughan.

In each case, a rod like centrosome has been seen. It is Feulgen-negative and divides during interphase. At this stage the centromeres of each chromosome are closely packed against the centrosome, chromosome arms diverging from this point. Centrosome plays an active part in spindle formation, delimitation and polarity of ascospores.

In the genus *Sordaria*, the ascus contains eight nuclei in telophase III; each of them possessing its particular centrosome. These centrosomes then cut out eight uninucleate ascospores. A new mitosis takes place. The mature ascospore is therefore binucleate.

In the genus *Pleurage* facts are similar for species with eight or sixteen ascospores per ascus. However, one of the two nuclei produced by the last mitosis migrates in the differentiating primary appendage. A wall is formed between the spore proper and the appendage which ultimately degenerates.

In *Pl. anserina* and *Pl. minuta* f. 4 spores, the ascus contains also eight nuclei and eight centrosomes in telophase III, but these group in four pairs. The paired centrosomes jointly cut out four ascospores including two non-sister nuclei. These undergo mitosis and, out of the four so formed nuclei one migrates in the primary appendage.

Depending on the species, the chromosome number is either $n=6$ or $n=7$. One chromosome is attached to the nucleolus.

2. — Following X-rays treatment, we have obtained — in *Sordaria macrospora* — 3 genic mutants where the normal course of meiosis and the mechanism of ascospores delimitation are strongly altered. This has enabled us to study experimentally the functions of the centrosome.

a) In the mutant ir_1 , asci contain a variable number of ascospores : one to eight. Through meiosis study of this mutant, nuclei and their centrosomes have been seen unevenly distributed within the ascus. At the stage when cytoplasmic masses delimitate, as ascospores primordia, the cytoplasm is cut out unevenly following the uneven centrosomes distribution in the ascus : a single cytoplasmic mass may contain two, three, four, ... nuclei if the corresponding centrosomes are closed together.

b) In the mutant sps_1 , asci usually contain more than eight spores, many of which abort and remain colourless, instead of turning deep black.

These asci are seen to arise through crozier mechanism, but they remain binucleate, the normal fusion does not take place.

When the ascus contains eight nuclei, the eight centrosomes are seen to undergo a supplementary mitosis. Consequently eight nuclei and six centrosomes are to be found in the ascus.

When cytoplasmic masses delimitate, their number is usually greater than eight, owing to the existence of the sixteen centrosomes. Supplementary spores are devoid of nucleus.

Therefore the cytological study of the mutant sps_1 supports the view that ascospore delimitation is induced by the centrosome.

c) In the mutant as_1 , asci contain both aborted and viable spores. These are much bigger than normal ascospores.

At prophase I, the fourteen chromosomes of the diploid nucleus remain as univalents. Later, some centrosomes seem to loose contact with their nucleus, and they may be found isolated in the cytoplasm, sometimes a long way apart.

Therefore, some chromosomes groups have lost their centrosomes and are seen to be unable to undergo anaphase movement.

When the total number of centrosomes comes to eight, ascospore delimitation takes place, giving simultaneously ascospores with or without nuclei.

Therefore, the cytological study of this mutant supports the view that the centrosome (possibly in cooperation with the centromeres), is responsible of spindle organization : without centrosome, no anaphase movement takes place.

3. — Among the twelve species of *Sordaria* and *Pleuraea* above mentioned, we have chosen *Sordaria macrospora* Auersw. for detailed genetical study. This choice has been made for the following reasons :

a) The life cycle of this fungus is very short : 8 days at 29° C.

b) It is easy to cultivate on a simple medium (Dodge corn meal agar).

c) The ascospores are linearly arranged within the ascus and big enough to be extracted in their order by means of a thin needle.

d) This species is homothallic and therefore well suited for induction of mutations by means of radiations and mutagenic chemicals.

Up to now this species had not yet been subjected to detailed genetic analysis.

4. — Following X-rays treatment we have obtained, in *Sordaria macrospora*, 81 different genic mutants. They may be classified in five groups :

a) Mutations modifying ascospore color : the wild type of *S. macrospora* has black ascospores, but we have isolated 58 mutants where this character is altered. The spores may be white, yellow, pink, green, violet, etc... In all, nine distinct loci have been identified : bl_1 , j_1 , j_2 , r_1 , r_2 , vo_1 , vo_2 , v_1 , bf .

b) Mutations modifying ascospores arrangement within the ascus : 5 mutants having ascospores in disorder or distributed in 2 rows, have been obtained. 4 distinct loci are concerned : ds_1 , ds_2 , ds_3 , ds_4 .

It must be stressed upon the fact that this character, of great taxonomical importance, has simple genetic basis.

c) Mutations modifying size and shape of ascospores : although the wild type has ellipsoidal ascospores of mean length $21,2 \mu$, we have been able to isolate 2 distinct mutants having spherical spores of smaller diameter (respectively : $16,8 \mu$ and $18,8 \mu$).

In another mutant (spa_1), the ascospores are longer (mean length : $23,9 \mu$). By their shape, they are comparable to *S. fimicola*, another related species.

These 3 mutants are interesting, because a single gene proves able to modify characters of taxonomical importance.

Three loci are involved : spp_1 , spp_2 , spa_1 .

d) Mutations modifying number and size of ascospores : to this group belong 13 mutants. Some of them have been already mentioned, as they have enabled us to clear up the centrosome functions : ir_1 , sps_1 , as_1 . Eight distinct loci have been identified : gi_1 , vi_1 , sps_1 , sps_2 , sps_3 , as_1 , an_1 , an_2 .

e) Mutations modifying growth and morphology of the mycelium. Two mutants of this group have been isolated. Two distinct loci are involved : cl_1 , cl_2 .

5. — We have found that most of the genes affecting ascospore color have an autonomous behaviour (the mutant character is visible within the hybrid ascus arising from the cross with the black wild type) : this is the case for bl_1 , j_1 , j_2 , r_1 , r_2 , vo_1 , vo_2 , v_1 . However bf is non-autonomous (all spores in the hybrid ascus are black).

On the other hand, all mutants belonging to group (b), (c) and (d) are non-autonomous. That is to say when these mutants are crossed with the wild type, the hybrid asci so obtained are strictly identical with the wild type ones. Consequently, the crossing of these mutant two by two also gives wild type hybrid asci. We consider that this phenomenon arises from the fact that the character of an ascus is dependent upon the genetical constitution of the two nuclei of the ascogenous cell (the genes are supposed to be recessive).

6. — In the course of our research work on the genetic action of X-rays, we have come across a great number of chromosomal aberrations. These result in the production of aborted spores. Along classical lines we have developed the general theory in the case of reciprocal translocation and of para- and pericentric inversions. It is in good agreement with experimental facts.

The quantitative study of the aberrations has shown that the developmental state of hyphae at the moment of irradiation (either in growth or in resting stage) is of great importance. The percentage of bunches of asci segregating for aborted spores is maximum at a given dosis and falls down for a still higher dosis.

7. — Fifty-five chemicals have been screened in a search for mutagenic activity. The following chemical groups have been studied :

a) Acridine and some of its substituted derivatives.

b) Chemicals related to acridine or resulting from a simplification of its molecule.

c) Derivatives of thiourea.

d) Phenylcarbamates.

Four chemicals have shown interesting mutagenic properties : acridine, euflavine, allylthiosemicarbazide, allylsenevol.

The two last ones are able to induce both point mutations and chromosomal aberrations. The relative proportion of these two types of mutants is very different from that obtained following X-rays treatment.

8. — Acridine, dissolved in the culture medium at a concentration of 3 mg per 100 cm³ strongly slows down mycelial growth. The mycelium finally dies within a fortnight after the beginning of the experiment. However, there develop at several points mycelial colonies very varied in size and appearance.

The mycelium taken out of these colonies and transplanted on the normal culture medium, without acridine, gives strains having low or very low growth speed, in all cases much inferior to that of the initial wild type.

Twenty distinct variants (A-1 ... A-20) have been so isolated. They keep their characters during successive transfers, and we have established the

fact that all of them were simple genic mutants. These slow growing strains are mutants resistant to acridine. This chemical has general mutagenic activity. However, in the particular conditions of the experiment referred to above, acridine makes a selection among the mutants it itself induces.

A genetical study of the twenty variants has shown that eleven distinct loci are involved. One of these mutated nine times; this seems to show either a very high mutability or a semi-specific action of acridine on this particular locus.

We have investigated whether the slow growth of mutants was due to a modification of the cytochroms system. Three distinct methods (measure of respiration-rate by Warburg's technique with and without sodium azide, study of the cytochroms spectrum, Nadi reaction) have established that the mutants induced by acridine have a normal cytochroms system.

Mutants representative of the eleven loci identified have been mixed two by two (55 crosses). In most of these experiments, a heterocaryotic mycelium, wild type looking, grows out of the mixture and quickly fill up the Petri dish. However, in eleven confrontations, a wild type mycelium has never been obtained.

9. — Euflavine dissolved in the culture medium at a concentration of 1 per 2.000 gives abnormal growth of hyphae. Transfers of mycelium, done within the first twenty-four hours, lead to steriles cultures.

Mycelium so modified has a very irregular growth and shows a very rapid senescence, some hyphae stopping altogether after zigzag growth.

Out of a cross of a sterile culture with the wild type, one gets hybrid asci. It is easy to extract ascospores out of these asci: all of them give rise to perfectly fertile cultures. Consequently the character of sterility induced by euflavine has a cytoplasmic mode of inheritance.

10. — We have measured the post-reduction percentage (and so determined the distance to the centromere), for autonomous genes affecting ascospore color as well as for some other genes.

In several cases we have found values significantly higher than the theoretical limit of 66,7 %.

For genes governing ascospore color, measures have been made at 3°, 9°, 12°5, 17°5, 21° and 27°. We have found that temperature has a very strong influence on crossing-over. However, according to the genes concerned, a rise of temperature may result either in an increase or a decrease of the post-reduction percentage.

11. — In order to clear up mutual relations between identified loci, we have chosen as reference system the eight autonomous genes governing ascospore color. By this means we have found six linkage groups (*S. macrospora* has 7 chromosomes). These groups contain the following genes:

Group I : r_1 ; j_2 ; A-1; A-3; A-5; A 10; A-16; A-17.

Group II : j_1 , A-7; A-15; A 19.

Group III : vo_2 ; A 2.

Group IV : v_1 ; r_2 .

Group V : vo_1 .

Group VI : bl_1 .

12. — We have inquired whether the centrosome, which divides during each interphase, has under its *direct* control, some hereditary characters. If this is the case, the characters are likely to concern spindle and ascospore delimitation, namely : spindle orientation ; size, shape and number of ascospores.

Among the mutants of our collection, we have chosen the following ten : ds_1 , ds_2 , ds_3 , sps_1 , sps_2 , sps_3 , spp_1 , as_1 , spa_1 , ir_1 .

If we suppose that these 10 genes are all localized on the centrosomes (and not on the chromosomes), they must be in a single linkage group.

We have therefore crossed two by two the ten preceding strains. Only two linkages have been established, namely :

sps_1 and spp_1

sps_3 and ir_1

The six remaining genes are mutually independent.

Therefore it may be concluded that the ten genes are not members of a single linkage group.

Their behaviour rather indicates that they are distributed on the seven chromosomes of *S. macrospora*. Consequently there is no reason to suppose that the centrosome bears hereditary determinants.

13. — Making use of the ir_1 mutant (irregular spores), we have established that the eight autonomous genes governing ascospore color are recessive. A single dose of the wild type allele is still dominant over two doses of a mutant allele.

14. — In crosses between genetically distinct strains, it is common to find perithecia with a mosaic wall, containing two kinds of nuclei.

15. — In each cross are found bunches of asci of purely hybrid origin, and mixed bunches having a hybrid sector and a parental sector.

We have established the fact that this is a secondary phenomenon. Generally, there are only two nuclei at the origin of a bunch of asci.

16. — A study of the four alleles bl_1 , bv , be_1 , be_2 , has shown that bl_1 , be_1 , be_2 are true alleles, but that bv bears a small chromosome aberration resulting in the production of black wild type spores in crosses with the three others.

BIBLIOGRAPHIE

1. AMES (L. M.), 1934. — Hermaphroditism involving self-sterility and cross-fertility in the ascomycete *Pleuraea anserina*. *Mycologia*, 26, 292-414.
2. ATWOOD (K. C.), and PITTINGER (T. H.), 1955. — The efficiency of nuclear mixing during heterokaryon formation in *Neurospora crassa*. *Am. Jour. Bot.*, 42, 496-500.
3. AUERBACH (Ch.), 1949. — Chemical mutagenesis. *Cambridge Phil. Soc. Biol. Rev.*, 24, 355-389.
4. — 1951. — Problems in chemical mutagenesis. *Cold Spr. Harb. Symp.*, XVI, 199-213.
5. BARRATT (W. R.), NEWMEYER (D.), PERKINS (D. D.) and GARNJOEST (L.), 1954. — Map construction in *Neurospora crassa*. *Advances in Genetics*, VI, 1-86.
6. BAUCH (R.), 1942. — Chemogenetische Untersuchungen an der Hefe. *Ber. deut. bot. Ges.*, 60, 42-63.
7. BEADLE (G. W.), 1947. — Genes and the chemistry of the organism. *Science in Progress*, 5, 166-196.
8. BEADLE (G. W.), and COONRADT (V. L.), 1944. — Heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 29, 291-308.
9. BISTIS (G.), 1956. — Studies on the genetics of *Ascobolus stercorarius* (Bull.) Schröt. *Bull. Torrey bot. Club*, 83, 35-61.
10. BRETZLÖFF, 1951. — Fungus fruiting in submerged culture. *Science*, 114, 418-419.
11. BRETZLOFF (C. W.), 1954. — The growth and fruiting of *Sordaria fimicola*. *Am. Jour. Bot.*, 41, 58-67.
12. BRYSON (V.) and SZYBALSKI (W.), 1955. — Microbial drug resistance. *Advances in genetics*, 7, 1-46.
13. CAIN (R. F.), 1934. — Studies of Coprophilous sphaeriales in Ontario. *Univ. Toronto studies. Biolog. series*, n° 38, 1-126.
14. CATCHESIDE (D. G.), 1944. — Polarized segregation in an Ascomycete. *Ann. Bot. (n. s.)*, 8, 119-130.
15. — 1951. — The genetics of microorganisms. 1 vol., Pitman, Londres.
16. CHADEFAUD (M.), 1944. — Biologie des Champignons. 1 vol., Gallimard édit., Paris.
17. CHEN (S. Y.), EPHRUSSI (B.) et HOTTINGUER (H.), 1950. — Nature génétique des mutants à déficience respiratoire de la souche B-II de la levure de boulangerie. *Heredity*, 4, 337-351.
18. COLSON (B.), 1934. — The cytology and morphology of *Neurospora tetrasperma* Dodge. *Ann. Bot.*, 48, 211-224.
19. CUTTER (V. M.), 1946. — Smear methods for the study of chromosomes in Ascomycetes. *Stain Technol.*, 21.
20. — 1946. — The chromosomes of *Neurospora tetrasperma*. *Mycologia*, 38, 693-698.
21. — 1951. — The cytology of the fungi. *Ann. Rev. Microbiol.*, 5, 17-34.
22. D'AMATO (F.), 1950. — Studio statistico dell'attività mutagena dell'acridina e derivati. *Caryologia*, II, 229-297.
23. — 1950. — Mutazioni clorofilliane nell'orzo indotte da derivati acridinici. *Ibid.*, III, 211-220.
24. — 1951. — Nuovi dati sull'attività mutagena dei derivati dell'acridina. *Ibid.*, 311-326.

25. — 1952. — Further investigations on the mutagenic activity of acridines. *Ibid.*, IV, 388-413.
26. DANGEARD (P. A.), 1903. — Recherches sur le développement du périthèce chez les Ascomycètes. *Le Botaniste*, 9, 59-303.
27. — 1907. — Recherches sur le développement du périthèce chez les Ascomycètes. 2^e partie. *Le Botaniste*, 10, 1-385.
28. DARLINGTON (C. D.), 1939. — Misdivision and genetics of the centromere. *Jour. Genetics*, 37, 341-364.
29. DENGLER (I.), 1937. — Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an *Sordaria macrospora* Auersw., *S. uvicola* Viala et Mars. und *S. brefeldii* Zopf. *Jahrb. wiss. Bot.*, 84, 427-448.
30. DODGE (B. O.), 1927. — Nuclear phenomena associated with heterothallism and homothallism in the ascomycete *Neurospora*. *Jour. Agric. Res.*, 35, 289-305.
31. — 1928. — Spore formation in asci with fewer than eight spores. *Mycologia*, 20, 18-21.
32. — 1932. — The non-sexual and sexual functions of microconidia of *Neurospora*. *Bull. Torrey bot. Club*, 59, 347-360.
33. — 1932. — Heterothallism and hypothetical hormones in *Neurospora*. *Ibid.*, 58, 517-522.
34. — 1934. — A lethal for ascus abortion in *Neurospora*. *Mycologia*, 26, 360-376.
35. — 1935. — A recessive factor lethal for ascospore formation in *Neurospora*. *Bull. Torrey bot. Club*, 62, 117-128.
36. — 1935. — The mechanics of sexual reproduction in *Neurospora*. *Mycologia*, 27, 418-438.
37. — 1936. — Spermatia and nuclear migrations in *Pleuraea anserina*. *Ibid.*, 28, 284-291.
38. — 1936. — Interspecific hybrids involving factors for ascus abortion in *Neurospora*. *Am. Jour. Bot.*, 23, 555-561.
39. — 1937. — Spindle orientation and spore delimitation in *Gelasinospora tetrasperma*. *Cytologia*, Fujii Jub., 877-887.
40. — 1939. — Some problems in the genetics of the fungi. *Science*, 90, 379-385.
41. — 1939. — A new dominant lethal in *Neurospora*. The E locus in *N. tetrasperma*. *Jour. Hered.*, 30, 467-474.
42. — 1940. — Second division segregation and crossing-over in the fungi. *Bull. Torrey bot. Club*, 67, 467-476.
43. — 1942. — Heterokaryotic vigor in *Neurospora*. *Ibid.*, 69, 75-91.
44. — 1942. — Conjugate nuclear division in the fungi. *Mycologia*, 34, 302-307.
45. DODGE (B. O.) and APPEL (A.). — Breeding *Neurospora* from aborted asci. *Bull. Torrey bot. Club*, 71, 199-206.
46. DODGE (B. O.), SINGLETON (J. R.) and ROLNICK (A.), 1950. — Studies on lethal E gene in *Neurospora tetrasperma*, including chromosome counts also in races of *N. sitophila*. *Proc. Am. Phil. Soc.*, 94, 38-52.
47. DODGE (B. O.), 1955. — Phenocopies in *Neurospora*. *Jour. of Heredity*, 46, 2-8.
48. DOWDING (E. S.), 1931. — The sexuality of the normal, giant, and dwarf spores of *Pleuraea anserina* (Ces.) Kuntze. *Ann. Bot.*, 45, 1-14.
49. EHRENBERG (L.), 1955. — Factors influencing radiation induced lethality, sterility and mutation in barley. *Hereditas*, 41, 123-146.
50. EPHRUSSI (B.), 1949. — Action de l'acridine sur les levures. Unités biologiques douées de continuité génétique. 1 vol., CNRS, Paris, 165-180.
51. — 1951. — Remarks on cell heredity. *Genetics in the 20th Century*. 1 vol., Mac Millan, New-York, 241-262.
52. EPHRUSSI (B.) and HOTTINGUER (H.), 1950. — Direct demonstration of the mutagenic action of euflavine on Baker's yeast. *Nature*, 166, 956.
53. — 1951. — On an unstable cell state in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 16, 75-84.

54. EPHRUSSI (B.) et CHIMENES (A. M.), 1949. — Action de l'acri flavine sur les levures. I. La mutation « petite colonie ». *Ann. Inst. Pasteur*, 76, 351-364.
55. EPHRUSSI (B.), CHIMENES (A. M.) et TAVLITZKI (J.), 1949. — Action de l'acri flavine sur les levures. II. Etude génétique du mutant petite colonie. *Ann. Inst. Pasteur*, 76, 419-450.
56. EPHRUSSI (B.), L'HÉRITIER (Ph.) et HOTTINGUER (H.), 1949. — Action de l'acri flavine sur les levures. VI. Analyse quantitative de la transformation des populations. *Ann. Inst. Pasteur*, 77, 64-83.
57. FAULL (J. H.), 1905. — Development of ascus and spore formation in Ascomycetes. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, 32, 77-114.
58. FERRARY (R.), 1955. — Etude comparée de l'activité stathmocinétique de la colchicine et de la thiocolchicine. *C. R. Acad. Sc.*, 240, 1717.
59. FINCHAM (J. R. S.), 1949. — Chromosome numbers in species of *Neurospora*. *Ann. Bot. (n. s.)*, 13, 23-26.
60. FRASER (H. C. I.) and WELSFORD (E. J.), 1908. — Further contributions to the cytology of the Ascomycetes. *Ann. Bot.*, 22, 465-477.
61. FRASER (H. C. I.), 1908. — Contributions to the cytology of *Humaria rutilans* Fries. *Ann. Bot.*, 22, 35-55.
62. FRASER (H. C. I.) and BROOKS (J.), 1909. — Further studies on the cytology of the ascus. *Ann. Bot.*, 23, 537-549.
63. GARNJOBST (L.), 1953. — Genetic control of heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Amer. Jour. Bot.*, 40, 607-614.
64. GÄUMANN (E. A.) and WYND (F. L.), 1952. — The Fungi, 1 vol.
65. GILKINET (A.), 1874. — Recherches morphologiques sur les Pyrénomycètes. I. Sordariées. *Bull. Acad. roy. Belg.*, 2^e sér., 37, fasc. 4.
66. GILLES (A.), 1950. — Evolution nucléaire chez *Neurospora tetrasperma*. *La Cellule*, 53, 395-415.
67. GORDON (W. W.) and Mc. KECHNIE (J. A.), 1945. — Colchicine-induced autopolyploidy in *Penicillium notatum*. *Lancet*, 248, 47-48.
68. GREIS (H.), 1936. — Entwicklungsgeschichte von *Sordaria fimicola* (Rob.). *Bot. Arch.*, 38, 113-151.
69. — 1942. — Befruchtungsvorgänge in der Gattung *Chaetomium*. *Jahrb. wiss. Bot.*, 90, 233-254.
70. — 1942. — Mutations-und Isolationsversuche zur Beeinflussung des Geschlechts von *Sordaria fimicola* (Rob.). *Zeit. Bot.*, 37, 1-116.
71. GROSS (S. R.), 1952. — Heterokaryosis between opposite mating types. *Am. Jour. Bot.*, 39, 574-577.
72. GUILLIERMOND (A.), 1905. — Remarques sur la karyokinèse des Ascomycètes. *Ann. Myc.*, 3, 343-361.
73. GWYNNE-VAUGHAN (H. C. I.), 1937. — Contributions to the study of *Lachnea melaloma*. *Ann. Bot. (n. s.)*, 1, 99-105.
74. GWYNNE-VAUGHAN (H. C. I.), and BROADHEAD (Q. V.), 1936. — Contributions to the study of *Ceratostomella fimbriata*. *Ann. Bot.*, 50, 747-758.
75. GWYNNE-VAUGHAN (H. C. I.) and WILLIAMSON (H. S.), 1930. — Contributions to the study of *Humaria granulata* Quel. *Ann. Bot.*, 44, 127-145.
76. GWYNNE-VAUGHAN (H. C. I.) and WILLIAMSON (H. S.), 1931. — Contributions to the study of *Pyronema confluens*. *Ann. Bot.*, 45, 355-371.
77. GWYNNE-VAUGHAN (H. C. I.) and WILLIAMSON (H. S.), 1932. — The cytology and development of *Ascobolus magnificus*. *Ibid.*, 46, 653-670.
78. GWYNNE-VAUGHAN (H. C. I.) and WILLIAMSON (H. S.), 1933. — The asci of *Lachnea scutellata*. *Ibid.*, 47, 375-383.
79. GWYNNE-VAUGHAN (H. C. I.) and WILLIAMSON (H. S.), 1934. — The cytology and development of *Ascophanus aurora*. *Ibid.*, 48, 261-273.
80. HARPER (R. A.), 1905. — Sexual reproduction and the organization of the nucleus in certain mildews. *Carnegie Inst. of Washington*, Public. n° 37, 104 p.
81. HEIM (M^{me} P.), 1952. — Observations sur le noyau des Ascomycètes. *Rev. de Mycol.*, 17, 3-38.

82. HEMMONS (L. M.), PONTECORVO (G.) and BUFTON (A. W. S.), 1952. — Perithecial analysis in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 6, 135.
83. HOLLAENDER (A.), SANSOME (E. R.), ZIMMER (E.) and DEMEREC (M.), 1945. — Quantitative irradiation experiments with *Neurospora crassa*. II. Ultra-violet irradiation. *Am. Jour. Bot.*, 32, 226-235.
84. HOLLOWAY (B. W.), 1955. — Genetic control of heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Genetics*, 40, 117-129.
85. HOULAHAN (M. B.), BEADLE (G. W.) and CALHOUN (H. G.), 1949. — Linkage studies with biochemical mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 34, 493-507.
86. HÜTTIG (W.), 1935. — Die Sexualität bei *Glomerella lycopersici* Krüger und ihre Vererbung. *Biol. Zentralbl.*, 55, 74-83.
87. JENSEN (K. A.), KIRK (I.), KOLMARK (G.) and WESTERGAARD (M.), 1951. — Chemically induced mutations in *Neurospora*. *Cold Spring Harb. Symp.*, XVI, 245-262.
88. KOLMARK (G.). — Mutagenic properties of certain esters of inorganic acids investigated by the *Neurospora* back-mutation test. *Compt. Rend. Lab. Carlsberg, sér. Physiol.*, 26, 205-220.
89. LEWIS (I. M.), 1911. — The development of the spores in *Pleurage zygospora*. *Bot. Gaz.*, 51, 369-373.
90. LILLY and BARNETT, 1947. — The influence of pH and certain growth factors on mycelial growth and perithecial formation by *Sordaria fimicola*. *Am. Jour. Bot.*, 34, 131-138.
91. LINDEGREN (C. C.), 1932. — The genetics of *Neurospora* II. Segregation of the sex factors in asci of *N. crassa*, *N. sitophila*, and *N. tetrasperma*. *Bull. Torrey bot. Club*, 59, 119-138.
92. — 1933. — The genetics of *Neurospora* III. Pure bred stocks and crossing-over in *N. crassa*. *Ibid.*, 60, 133-154.
93. — 1934. — The genetics of *Neurospora* IV. The inheritance of tan versus normal. *Am. Jour. Bot.*, 21, 55-65.
94. — 1936. — The structure of the sex chromosomes of *Neurospora*. *Jour. Hered.*, 27, 251-259.
95. LINDEGREN (C. C.) and SCOTT (M. M.), 1936. — Formation of the ascospore wall in *Neurospora*.
96. LINDEGREN (C. C.) and LINDEGREN (G.), 1937. — Non-random crossing-over in *Neurospora*. *Jour. Hered.*, 28, 105-113.
97. LINDEGREN (C. C.) and LINDEGREN (G.), 1939. — Non-random crossing-over in the second chromosome of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 24, 1-7.
98. LINDEGREN (C. C.) and RUMANN (S.), 1938. — The chromosomes of *Neurospora crassa*. *Jour. Genet.*, 36, 395-404.
99. LUCAS (G. B.), 1946. — Genetics of *Glomerella*. IV. Nuclear phenomena in the ascus. *Am. Jour. Bot.*, 33, 802-806.
100. MAIRE (R.), 1905. — Recherches cytologiques sur quelques Ascomycètes. *Ann. Mycol.*, 3, 123-154.
101. MARCOU (D.), 1954. — Sur la longévité des souches de *Podospira anserina* cultivées à diverses températures. *C. R. Acad. Sci.*, 239, 895.
102. — 1954. — Sur le rajeunissement par le froid des souches de *Podospira anserina*. *Ibid.*, 1153-1155.
103. MARCOVITCH (H.), 1951. — Action de l'acriflavine sur les levures. VIII. Détermination du composant actif et étude de l'eufflavine. *Ann. Inst. Pasteur*, 81, 452-468.
104. MATHER (K.) and BEALE (G. H.), 1942. — The calculation and precision of linkage values from tetrad analysis. *Jour. Genetics*, 43, 1-30.
105. MC CLINTOCK (B.), 1945. — *Neurospora*. I. Preliminary observations of the chromosomes of *Neurospora crassa*. *Amer. Jour. Bot.*, 32, 671-678.
106. MC GAHEN (J. W.) and WHEELER (H. E.), 1951. — Genetics of *Glomerella*. IX. Perithecial development and plasmogamy. *Amer. Jour. Bot.*, 38, 610-617.
107. MITCHELL (M.) and MITCHELL (H. K.), 1952. — A case of « maternal inheritance » in *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 38, 442-449.

108. MOREAU (F.) et MOREAU (M^{me}), 1931. — Existe-t-il une double réduction chez les Ascomycètes ? *Rev. Gén. Bot.*, 43, 465-473.
109. — 1951. — Observations cytologiques sur les Ascomycètes du genre *Pleuraea* Fr. *Rev. Mycologie*, 16, 198-208.
110. MOREAU (Cl.), 1953. — Les genres *Sordaria* et *Pleuraea*. 1 vol., Paris, *Lechevalier*, 330 p.
111. MOREAU (F.), 1953 et 1954. — Les champignons, Tomes I et II. Paris. *Encyclopédie Mycologie*. *Lechevalier*.
112. MOREAU (F.) et M^{me} MOREAU, 1954. — Sur le développement des périthèces du *Chaetomium elatum* Kunze. *Rev. Myc.*, 19, 167-171.
113. MOREAU (F.) et MORUZI (C.), 1931. — Recherches expérimentales sur la formation des périthèces chez les *Neurospora*. *C. R. Acad. Sci.*, 192, 1476.
114. MOREAU (F.) et MORUZI (C.), 1936. — Recherches sur la génétique des Ascomycètes du genre *Neurospora*. *Revue gén. Bot.*, 48, 393, 460, 518, 613, 658.
115. MORUZI (C.), 1935. — Sur des variations observées dans les cultures d'un champignon ascomycète : le *Sordaria macrospora*. *Auersw. Ass. fr. Avanc. Sc.*, 57^e Session, 290.
116. OLIVE (L. S.), 1953. — The structure and behavior of fungus nuclei. *Bot. Rev.*, 19, 439-586.
117. — 1956. — Genetics of *Sordaria fimicola*. I. Ascospore color mutants. *Am. Jour. Bot.*, 43, 97-107.
118. PAGE (W.), 1933. — A contribution to the life-history of *Sordaria fimicola* (four-spored form) with special reference to the abnormal spores. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 17, 296-301.
119. — 1936. — Note on abnormal spores in *Podospora minuta*. *Ibid.*, 20, 186-189.
120. PERKINS (D. D.), 1953. — The detection of linkage in tetrad analysis. *Genetics*, 38, 187-198.
121. PIEHL (A.), 1929. — The cytology and morphology of *Sordaria fimicola* Ces. et De Not. *Trans. Wis. Acad. Sci. Arts et Lett.*, 24, 323-341.
122. PITTMAN (D. D.), 1956. — The relation of population heterogeneity to the plateau phenomenon in radiation dose-response curves. *J. of Bacteriology*, 71, 500-501.
123. PITTINGER (T. H.) and ATWOOD (K. C.), 1956. — Stability of nuclear proportions during growth of *Neurospora* heterokaryons. *Genetics*, 41, 227-241.
124. PLOUGH (H. H.), 1917. — The effect of temperature on crossing-over in *Drosophila*. *Jour. Exp. Zool.*, 24, 147-210.
125. — 1921. — Further studies on the effect of temperature on crossing-over. *Ibid.*, 32, 187-202.
126. POLLISTER (A. W.) and POLLISTER (P. F.), 1943. — The relation between centriole and centromere in atypical spermatogenesis in viviparid snails. *Ann. New York Acad. Sci.*, 45, 1-48.
127. POMERLEAU (R.), 1938. — Recherches sur le *Gnomonia ulmea* (Schw.) Thüm. *Contr. Inst. Bot. Univ. Montréal*, n° 31, 139 p.
128. PONTECORVO (G.), 1946. — Genetics systems based on heterocaryosis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 11, 193-201.
129. — 1949. — « Balanced » heterokaryons in *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 3, 385.
130. — 1952. — Non-random distribution of multiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploid *Aspergillus*. *Nature* (London), 170, 204-205.
131. PONTECORVO *et al.*, 1953. — The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, V, 142-235.
132. PONTECORVO (G.), FORBES (E.) and ADAM (O. B.), 1949. — Genetics of homothallic ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Heredity*, 3, 385.
133. PONTECORVO (G.) and GEMMEL (A. R.), 1944. — Genetic proof of heterokaryosis in *Penicillium notatum*. *Nature* (London), 154, 514-515.

134. PONTECORVO (G.), ROPER (J. A.) and FORBES (E.), 1953. — Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Jour. Gen. Microbiol.*, 8, 198-210.
135. RITCHIE (D.), 1937. — The morphology of the perithecium of *Sordaria fimicola* (Rob) Ces. et De Not. *Jour. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 53, 334-342.
136. RIZET (G.), 1953. — Sur l'impossibilité d'obtenir la multiplication végétative ininterrompue et illimitée de l'Ascomycète *Podospora anserina*. *C. R. Acad. Sci.*, 237, 838.
137. — 1953. — Sur la longévité des souches de *Podospora anserina*. *Ibid.*, 1106.
138. RIZET (G.) et ENGELMANN (C.), 1949. — Contribution à l'étude génétique d'un Ascomycète tétrasporé : *Podospora anserina* (Ces.) Rehm. *Rev. Cyt. et Biol. vég.*, 11, 201-304.
139. RIZET (G.) et MARCOU (D.), 1954. — Longévité et sénescence chez l'Ascomycète *Podospora anserina*. 8^e Congrès Int. Bot., Paris, section 9, 121-128.
140. ROPER (J. A.), 1952. — Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia*, 8, 14-15.
141. RYAN (F. J.), 1943. — Crossing-over and second division segregation in fungi. *Bull. Torrey bot. Club.*, 70, 605-611.
142. RYAN (F. J.), BEADLE (G. W.) and TATUM (E. L.), 1943. — The tube method of measuring the growth rate of *Neurospora*. *Am. Jour. Bot.*, 30, 784-799.
143. SANSOME (E. R.), 1945. — Heterokaryosis and the mating-type factors in *Neurospora*. *Nature* (London), 156, 47.
144. — Heterokaryosis, mating-type factors, and sexual reproduction in *Neurospora*. *Bull. Torrey bot. Club.*, 73, 397-409.
145. — 1946. — Maintenance of heterozygosity in a homothallic species of the *Neurospora tetrasperma* type. *Nature* (London), 157, 484.
146. — 1947. — The use of heterocaryons to determine the origin of the ascogenous nuclei in *Neurospora crassa*. *Genetica*, 24, 59-64.
147. — 1956. — Camphor-induced gigas forms in *Neurospora*. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 39, 67-78.
148. SANSOME (E. R.), DEMEREC (M.) and HOLLAENDER (A.), 1945. — Quantitative irradiation experiments with *Neurospora crassa*. I, Experiments with X-rays. *Am. Jour. Bot.*, 32, 218-216.
149. SANSOME (E. R.) and BANNAN (L.), 1946. — Colchicine ineffective in inducing polyploidy in *Penicillium notatum*. *Lancet*, 250, 829.
150. SATINA (S.), 1916. — Studies in the development of certain species of the Sordariaceae. *Bull. Soc. Nat. Moscou*, 30, 106-142.
151. SCHÖNEFELDT (M.), 1935. — Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen bei *Neurospora tetrasperma* und *Neurospora sitophila*. *Zeit. ind. Abst. Vererb.*, 69, 193-209.
152. SHEAR (C. L.) and DODGE (B. O.), 1927. — Life histories and heterothallism of the red breadmold fungi of the *Monilia sitophila* group. *Jour. Agr. Res.*, 34, 1019-1042.
153. SINGLETON (J. R.), 1953. — Chromosome morphology and the chromosome cycle in the ascus of *Neurospora crassa*. *Am. Jour. Bot.*, 40, 124-144.
154. SLONIMSKI (P.), 1949. — Action de l'acriflavine sur les levures. IV, Mode d'utilisation du glucose par les mutants « petite colonie ». *Ann. Inst. Pasteur*, 76, 510-530.
155. — 1952. — Recherches sur la formation des enzymes respiratoires chez la levure. *Thèse, Faculté des Sciences*, Paris.
156. SLONIMSKI (P.) et EPHRUSSI (B.), 1949. — Action de l'acriflavine sur les levures. V, Le système des cytochromes des mutants « petite colonie ». *Ann. Inst. Pasteur*, 77, 47-63.
157. SRB (A. M.), 1956. — Spontaneous and chemically induced mutations giving rise to canavanine resistance in yeast. *Compt. Rendus Lab. Carlsberg*, sér. Physiol., 26, 363-380.

158. STADLER (D. R.), 1956. — A map of linkage group VI of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 41, 528-543.
159. — 1956. — Double crossing-over in *Neurospora*. *Ibid.*, 623-630.
160. STEVENS (R. B.), 1941. — Morphology and cytology of *Dermatocarpon aquaticum*. *Am. Jour. Bot.*, 28, 59-69.
161. TAVLITZKI (J.), 1949. — Action de l'acriflavine sur les levures. III. Etude de la croissance de mutants « petite colonie ». *Ann. Inst. Pasteur*, 76, 497-509.
162. VAZART (J.), 1956. — L'appareil cinétique chez les Protistes et dans le règne végétal. *Bull. Soc. bot. France*, 103, 162-221.
163. VELLUZ (L.) et MULLER (G.), 1954. — Synthèse et propriétés de la thiocolchicine. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 6, 755.
164. WHEELER (H. E.), OLIVE (L. S.), ERNEST (C. T.) and EDGERTON (C. W.), 1948. — Genetics of *Glomerella*. V, Crozier and ascus development. *Am. Jour. Bot.*, 35, 722-728.
165. WHITE (M. J. D.), 1934. — The influence of temperature on chiasma frequency. *Jour. Genetics*, 29, 203-215.
166. WHITEHOUSE (H. L. K.), 1942. — Crossing-over in *Neurospora*. *New Phytol.*, 41, 23-62.
167. — 1949. — Multiple-allelomorph heterothallism in the fungi. *Ibid.*, 48, 212-244.
168. — 1949. — Heterothallism and sex in the fungi. *Cambr. Phil. Soc. Biol. Rev.*, 24, 411-447.
169. WHITEHOUSE (H. L. K.) and HALDANE (J. B. S.), 1946. — Symmetrical and asymmetrical reduction in Ascomycetes. *Jour. Genet.*, 47, 208-212.
170. WILCOX (M.), 1928. — The sexuality and arrangement of the spores in the ascus of *Neurospora sitophila*. *Mycologia*, 20, 3-17.
171. WILSON (E. B.), 1902. — The cell in development and inheritance. Mac Millan édit.
172. WOLF (F. A.), 1912. — Spore-formation in *Podospora anserina* (Rabh) Winter. *Ann. Mycol.*, 10, 60-61.
173. ZICKER (H.), 1934. — Ueber künstliche Erzeugung von Miktoplonten bei Askomyceten. *Biol. Zentralbl.*, 51, 540-546.
174. — 1934. — Genetische Untersuchungen an einem heterothallischen Askomyzeten (*Bombardia lunata*, nov. sp.). *Planta*, 22, 573-613.
175. — 1937. — Die Vererbung des Geschlechts bei dem Ascomyzeten *Bombardia lunata* Zckl. *Zeit. ind. Abst. Vererb.*, 73, 403-408.

TABLE DES MATIÈRES

Chapitre I : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1	- Les genres <i>Sordaria</i> et <i>Pleurozia</i>	3
2	- L'espèce <i>Sordaria macrospora</i> Auersw.	5
3	- Technique d'isolement	6
4	- Milieu de culture	7
5	- Extraction et repiquage des ascospores	8

Chapitre II : ETUDE CYTOLOGIQUE

1	- Techniques	9
2	- Etude cytologique individuelle des espèces	11
3	- Caractères communs aux espèces étudiées	25
4	- Etude expérimentale des fonctions du centrosome	27
5	- Les recherches de A. W. et P. F. Pollister sur le centrosome	32
6	- Le centrosome chez les Sphérisales	36
7	- Conclusion d'ensemble	40

Chapitre III : MUTATIONS INDUITES PAR LES RADIATIONS

1	- Techniques	42
2	- Mutants obtenus :	
	a) Mutations affectant la couleur des ascospores	44
	b) Mutations affectant la disposition des ascospores dans l'asque	47
	c) Mutations affectant la taille et la forme des ascospores	50
	d) Mutations affectant le nombre et la taille des ascospores	51
	e) Mutations affectant la croissance et la morphologie du mycélium	55
3	- Analyse génétique des mutants :	
	A) Les méthodes	56
	B) Les résultats	59
4	- Remarques sur le comportement des caractères	68
5	- Différences dans les fréquences d'isolement des mutants géniques	69
6	- Mutations analogues chez d'autres espèces	70
7	- Remaniements chromosomiques :	
	a) La translocation réciproque. Cas général	72
	b) La translocation réciproque inégale	81
	c) L'inversion péricentrique	81
	d) L'inversion paracentrique	83
	e) Exemples de remaniements chromosomiques	83
	f) Etude quantitative	89

Chapitre IV : ETUDE DE L'ACTIVITÉ MUTAGÈNE DE DIVERSES SUBSTANCES

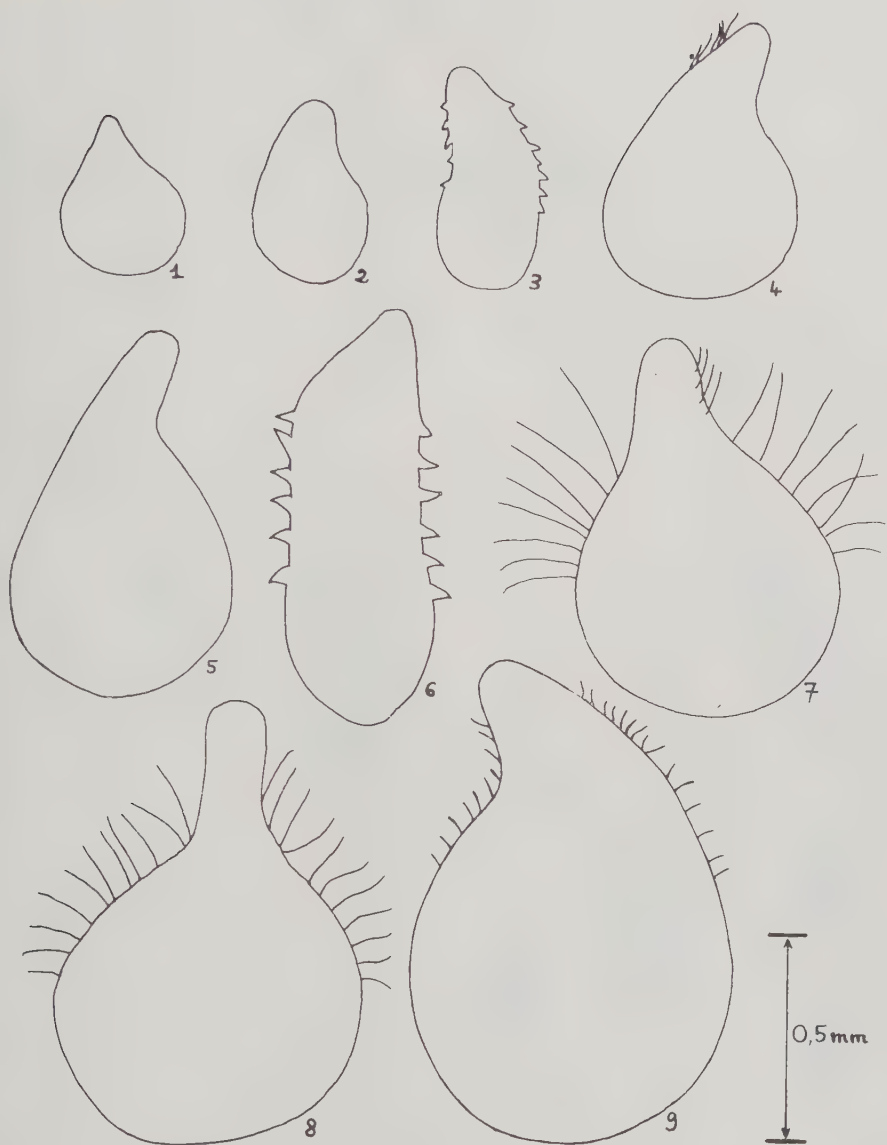
1 — Essais d'induction de polyploïdie	94
2 — Recherches de substances mutagènes	98
a) Acridine et dérivés	99
b) Substances apparentées à l'acridine	102
c) Dérivés de la thiourée	105
d) Phénylcarbamates	106
3 — Mutations induites par l'acridine	108
4 — Action de l'euflavine	115

Chapitre V : CONSTRUCTION DE LA CARTE GÉNIQUE

1 — Considérations générales	118
2 — Distance des gènes au centromère :	
a) Gènes commandant la couleur de l'ascospore	126
b) Autres gènes	130
3 — Rapports mutuels des gènes :	
a) Le système de référence	133
b) Les mutants à croissance lente (acridine)	151
c) Autres gènes	155
d) La carte génique	157

Chapitre VI : PROBLÈMES DIVERS

1 — Relations de dominance des gènes commandant la couleur de l'ascospore	178
2 — Origine de la paroi du périthèce	179
3 — Origine du bouquet d'asques	180
4 — Rapports entre les allèles bl_1 , bv , be_1 , be_2	185
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS	188
ENGLISH SUMMARY	195
BIBLIOGRAPHIE	201



Périthèces de diverses espèces de *Sordaria* et *Pleurage*

Fig. 1. — *Sordaria fimicola*

Fig. 2. — *Sordaria macrospora*.

Fig. 3. — *Pleurage minuta*.

Fig. 4. — *Pleurage anserina*.

Fig. 5. — *Pleurage decipiens* f. 16 sp.

Fig. 6. — *Pleurage curvula*.

Fig. 7. — *Pleurage setosa*.

Fig. 8. — *Pleurage zygospora*.

Fig. 9. — *Pleurage fimiseda*.



Asques de diverses espèces de *Sordaria* et *Pleurage*

Fig. 1. — *Sordaria fimicola*.

Fig. 2. — *Sordaria macrospora*.

Fig. 3. — *Pleurage decipiens* f. 8 spores.

Fig. 4. — *Pl. decipiens* f. 16 spores.

Fig. 9. — *Pleurage zygospora*.

Fig. 10. — *Pl. minuta* f. 8 spores.

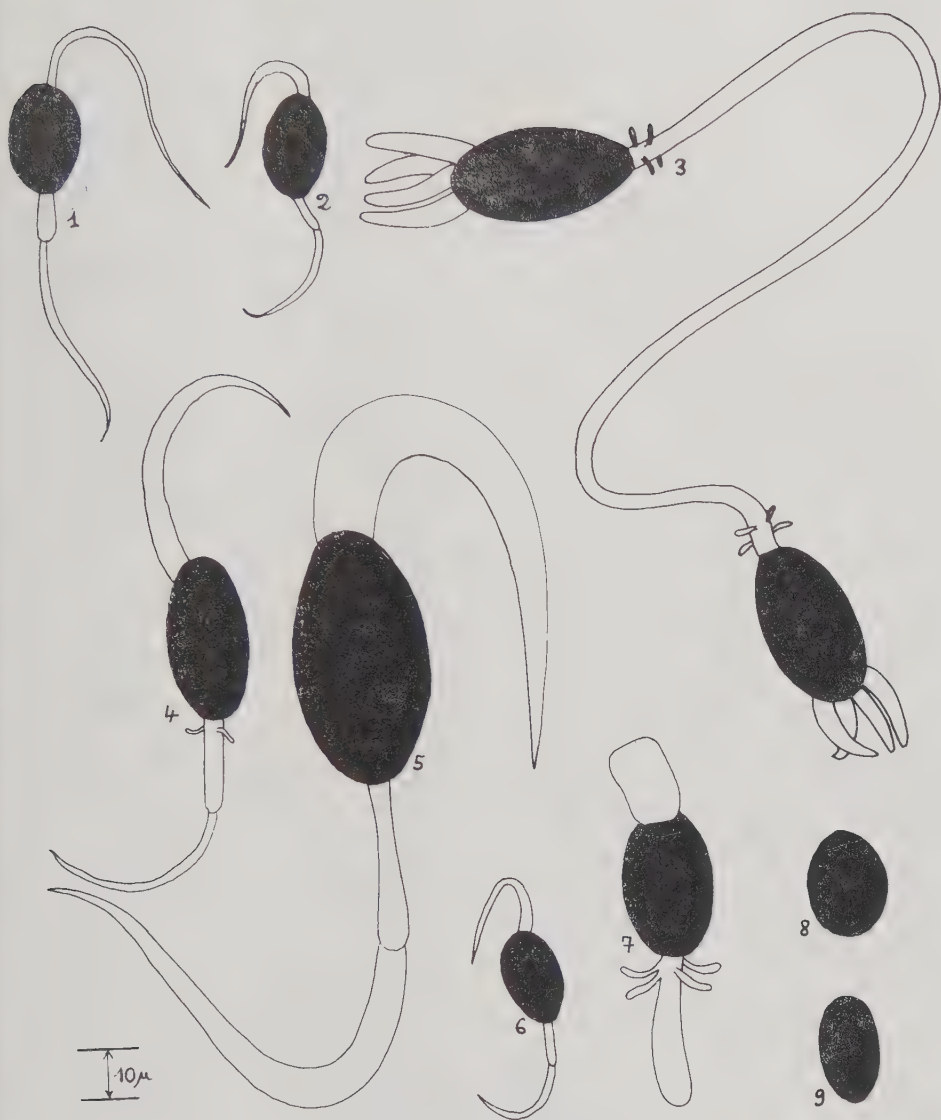
Fig. 11. — *Pleurage minuta* f. 4 spores.

Fig. 5. — *Pleurage setosa*.

Fig. 6. — *Pleurage fimiseda*.

Fig. 7. — *Pleurage anserina*.

Fig. 8. — *Pleurage curvula*.



Ascospores de diverses espèces de *Sordaria* et *Pleurage*

Fig. 1. — *Pleurage setosa*.

Fig. 2. — *Pleurage curvula*.

Fig. 3. — *Pleurage zygospora*.

Fig. 4. — *Pleurage anserina*.

Fig. 5. — *Pleurage fimiseda*.

Fig. 6. — *Pleurage minuta*.

Fig. 7. — *Pleurage decipiens*.

Fig. 8. — *Sordaria macrospora*

Fig. 9. — *Sordaria fimicola*.



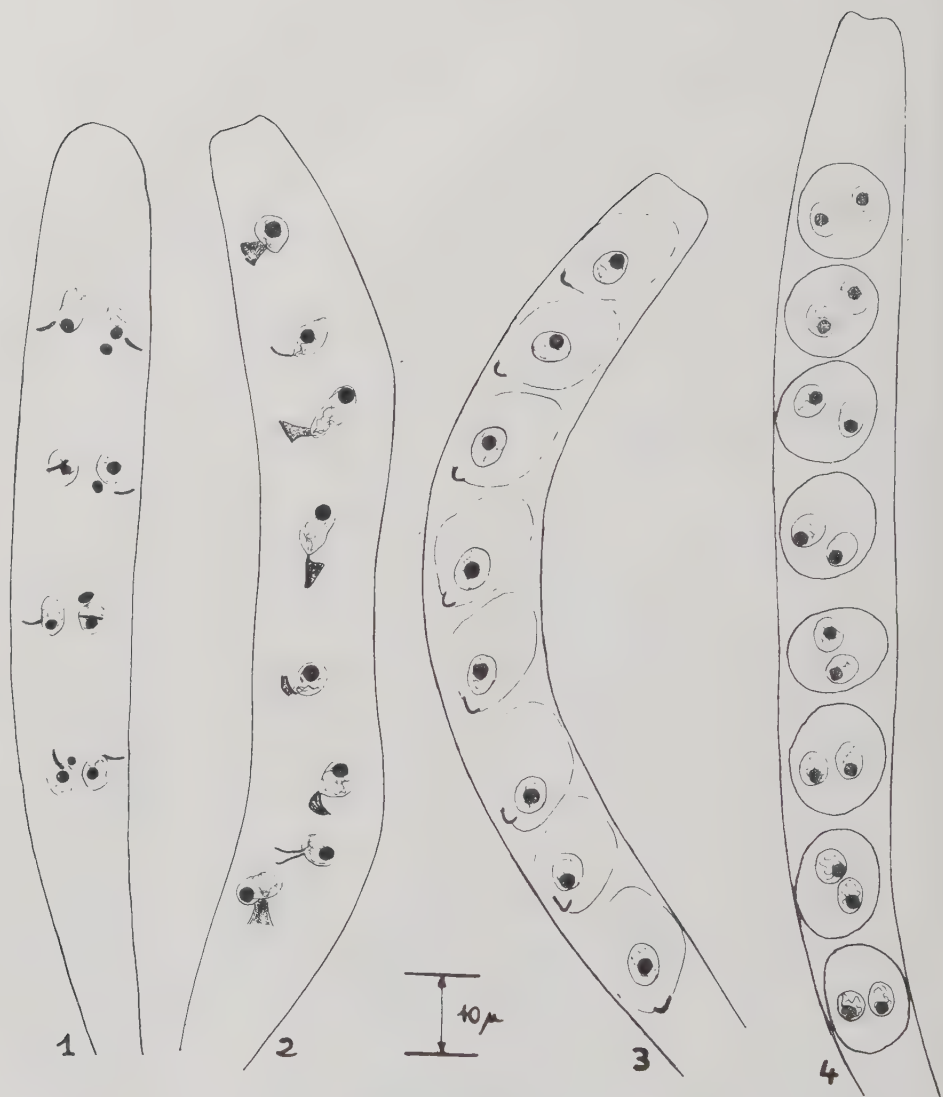
Sordaria macrospora

- Fig. 1. — Prophase I.
Fig. 2. — Fin d'anaphase I.
Fig. 3. — Prophase II.
Fig. 4. — Métaphase II.



Sordaria macrospora

- Fig. 1. — Fin d'anaphase II.
 Fig. 2. — Prophase II.
 Fig. 3. — Métaphase III.
 Fig. 4. — Fin d'anaphase III.



Sordaria macrospora

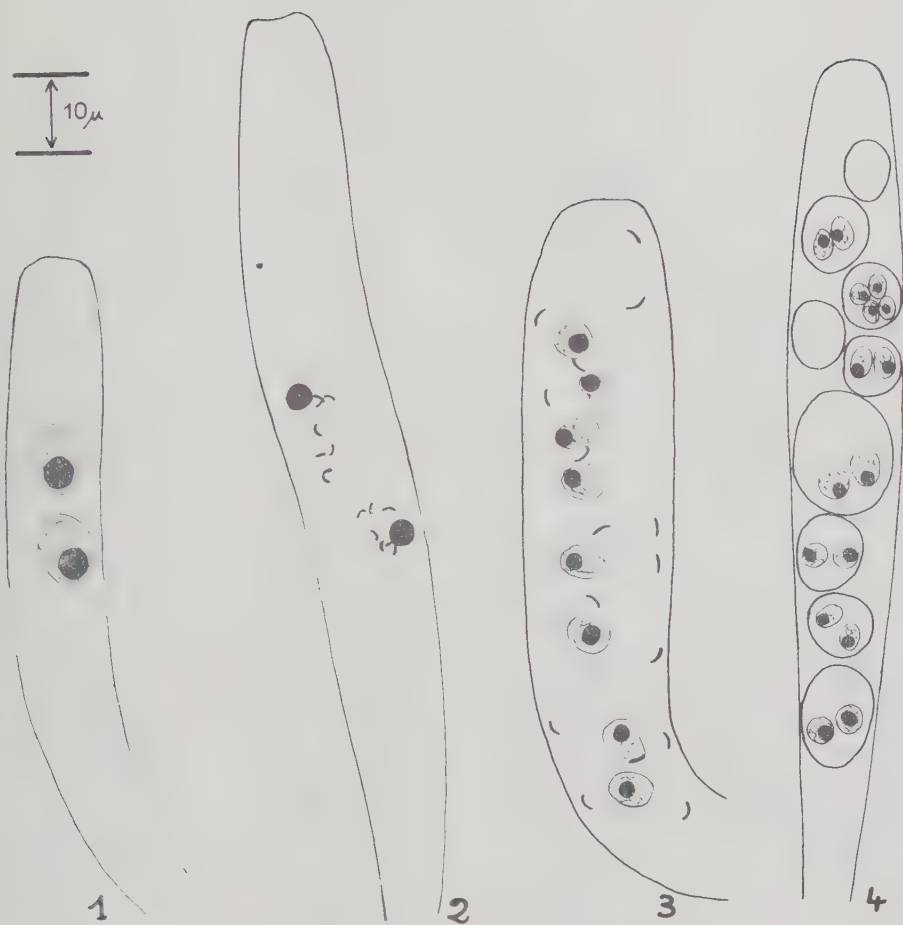
Fig. 1. — Télaphase III.

Fig. 2. — Télaphase III.

Asque écrasé montrant l'attachement de chaque centrosome à son noyau.

Fig. 3. — Délimitation des ascospores.

Fig. 4. — Huit spores binucléées.



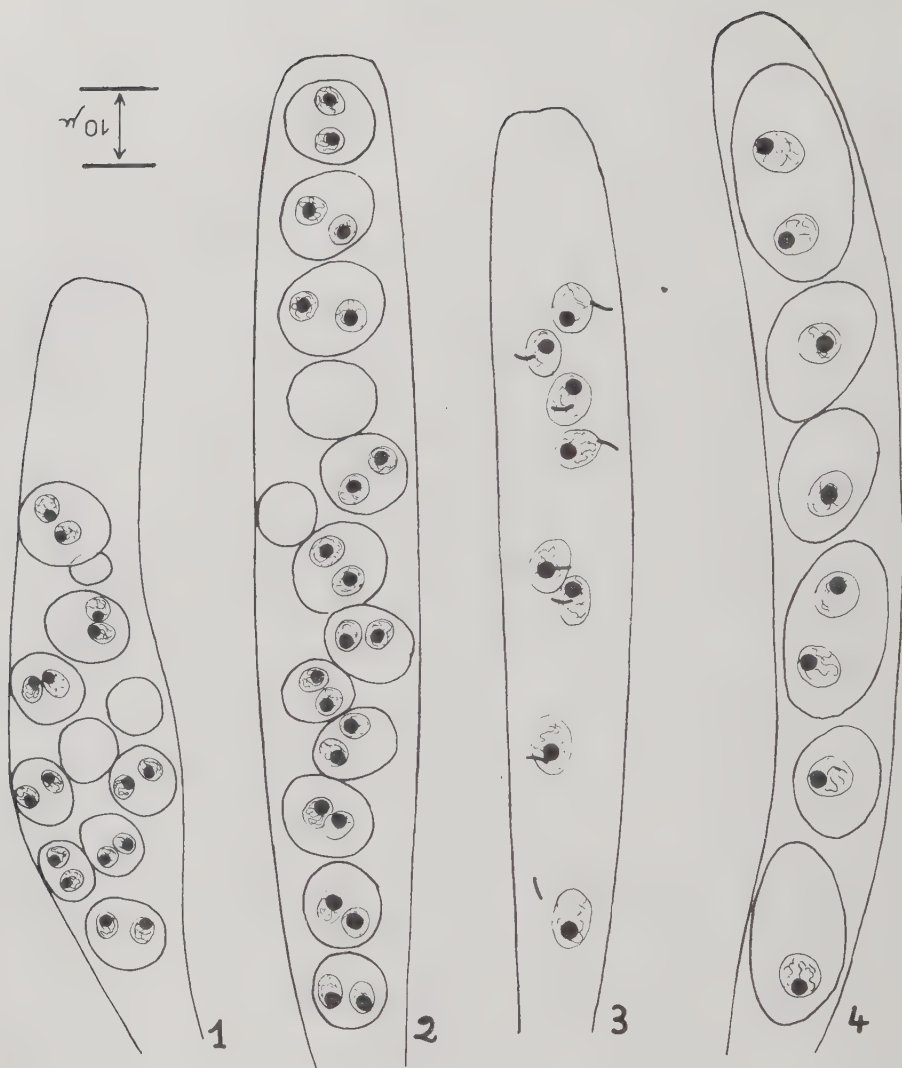
Sordaria macrospora. Mutant sps_1

Fig. 1. — Prophase I. Asque binucléé.

Fig. 2. — Métaphase I. Deux plaques avec sept univalents.

Fig. 3. — Télaphase III. Huit noyaux, seize centrosomes.

Fig. 4. — Asque contenant neuf ascospores, dont deux sans noyau.

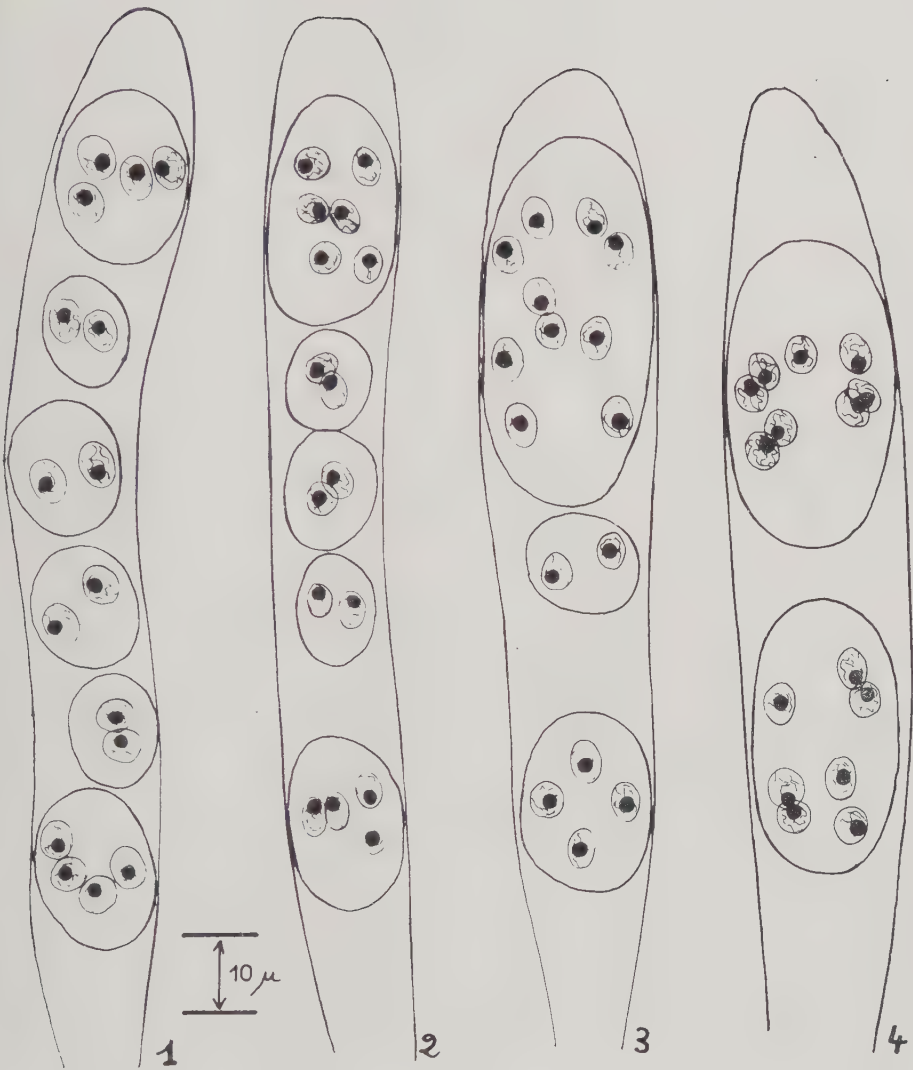


Sordaria macrospora. Mutant sps_1

- Fig. 1. — Asque contenant onze ascospores, dont trois sans noyau.
 Fig. 2. — Asque contenant treize ascospores, dont deux sans noyau.

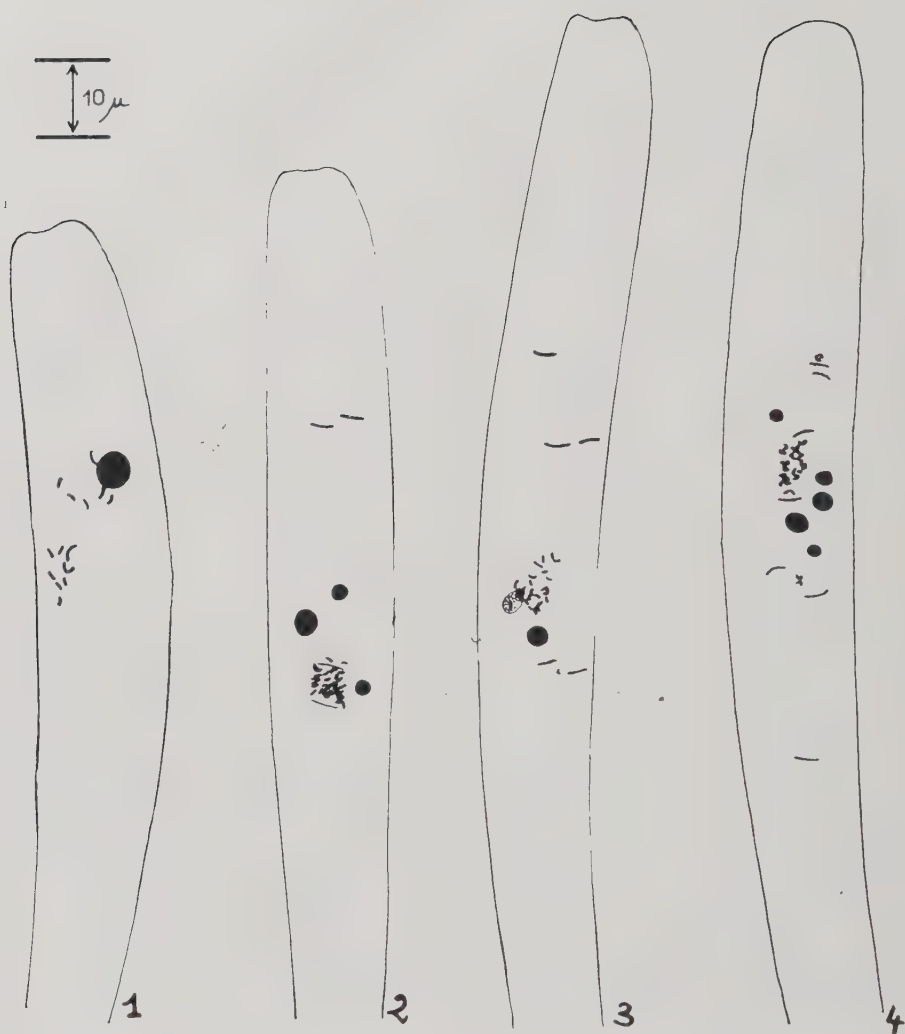
Sordaria macrospora. Mutant ir_1

- Fig. 3. — Télaphase III, montrant des inégalités dans la répartition des noyaux et des centrosomes.
 Fig. 4. — Asque renfermant six spores, dont deux binucléées. Au total huit noyaux, qui subiront encore une division.



Sordaria macrospora. Mutant ir_1

Fig. 1, 2, 3, 4. — Asques renfermant un nombre variable d'ascospores.
Au total seize noyaux.



Sordaria macrospora. Mutant as_1

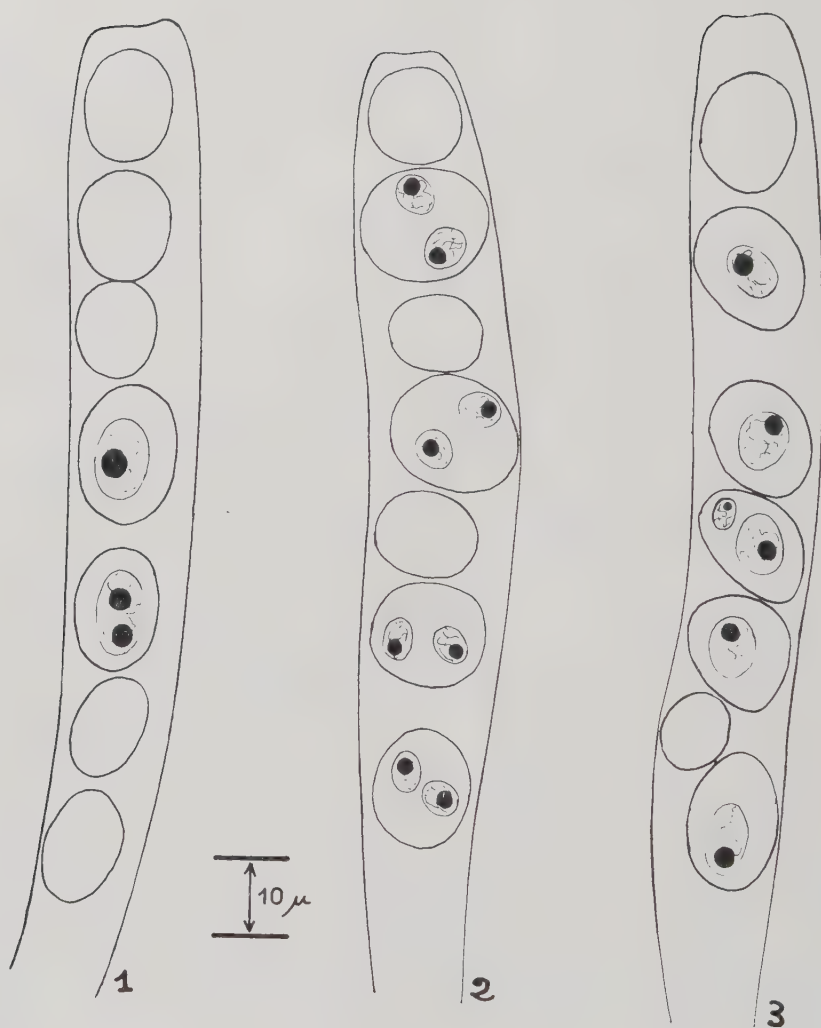
Fig. 1. — Métaphase I, avec quatorze univalents.

Fig. 2, 3, 4. — Divers stades montrant des centrosomes se divisant indépendamment dans le cytoplasme, et des groupes de chromosomes dépourvus de centrosomes.



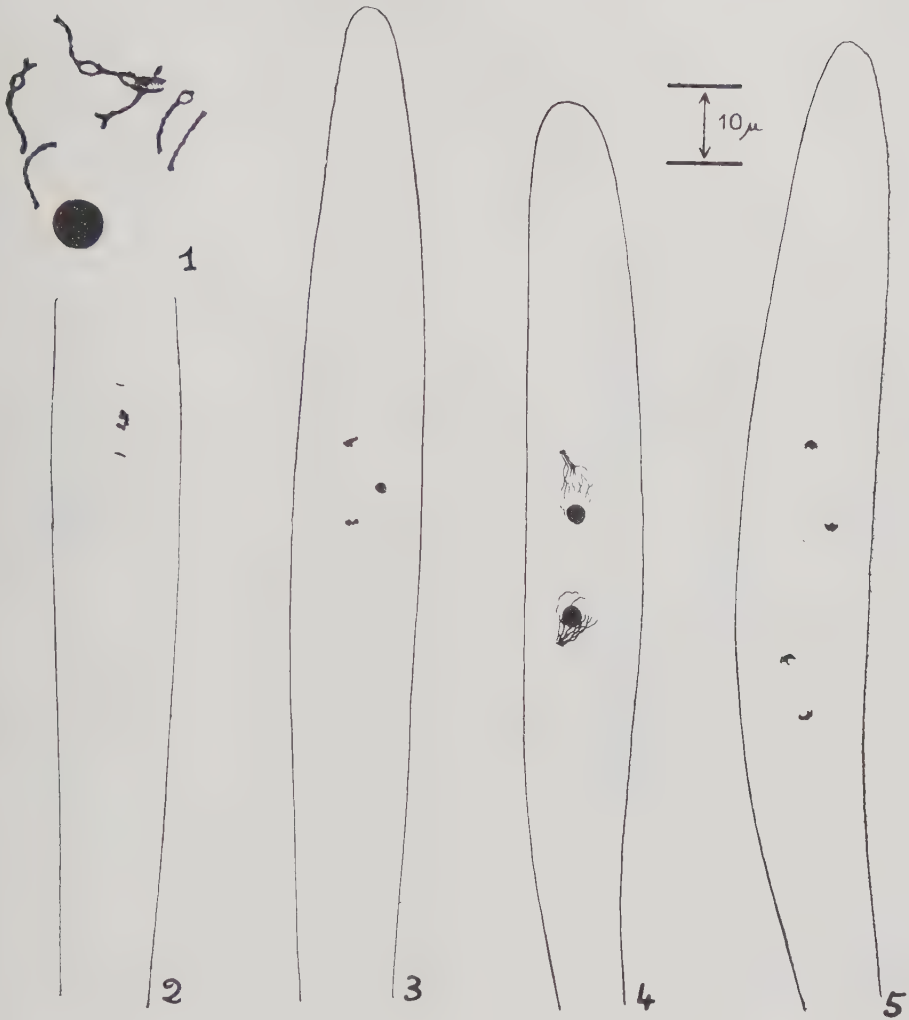
Sordaria macrospora. Mutant as_1

Fig. 1, 2, 3, 4. — Divers stades montrant l'existence de micro-noyaux, ainsi que l'absence de mouvement anaphasique des chromosomes lorsqu'ils ont perdu leurs centrosomes. (Comparer les fig. 3 et 4.)



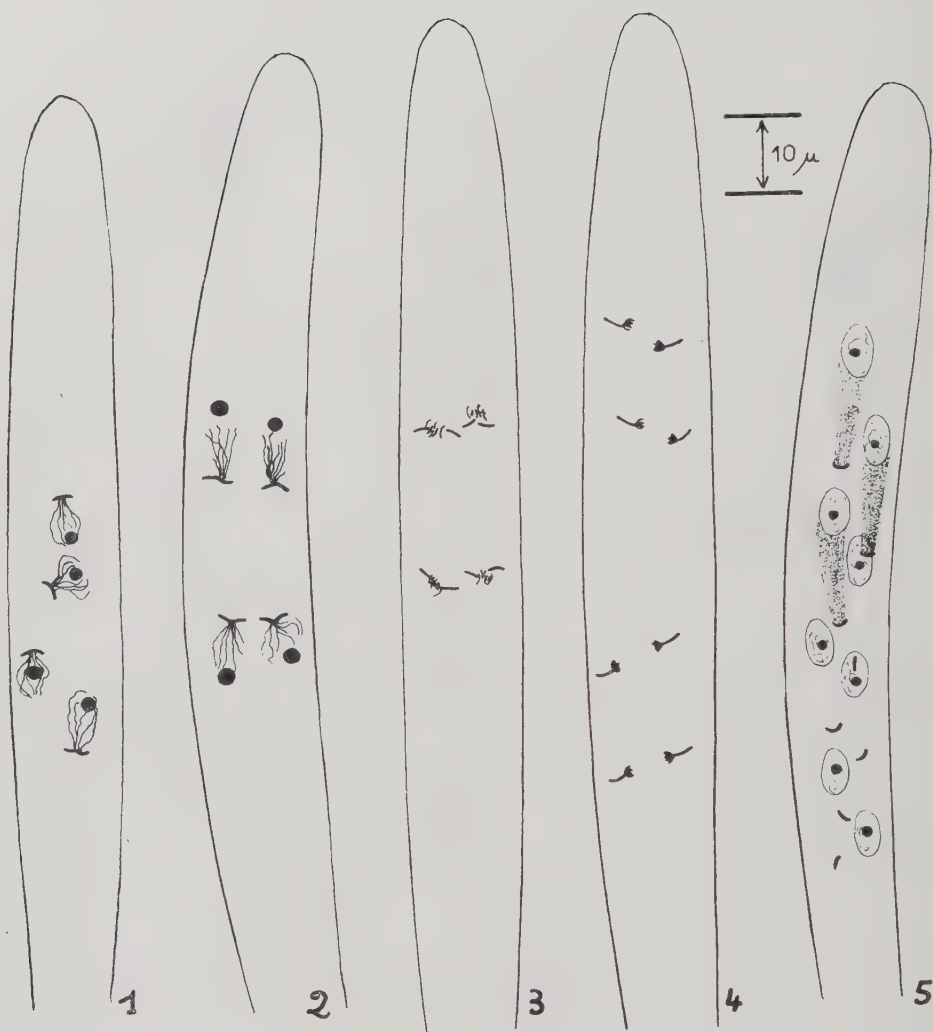
Sordaria macrospora. Mutant as_1

Fig. 1, 2, 3. — Asques renfermant un nombre variable d'ascospores nucléées et anucléées.



Pleurage decipiens f. 8 spores

- Fig. 1. — Diacinèse. Six bivalents. Le centrosome (double) semble attaché à l'extrémité d'un des bivalents.
 Fig. 2. — Métaphase I ($n = 6$). Centrosomes marquant les pôles du fuseau.
 Fig. 3. — Fin d'anaphase I.
 Fig. 4. — Prophase II.
 Fig. 5. — Fin d'anaphase II.



Pleurage decipiens f. 8 spores

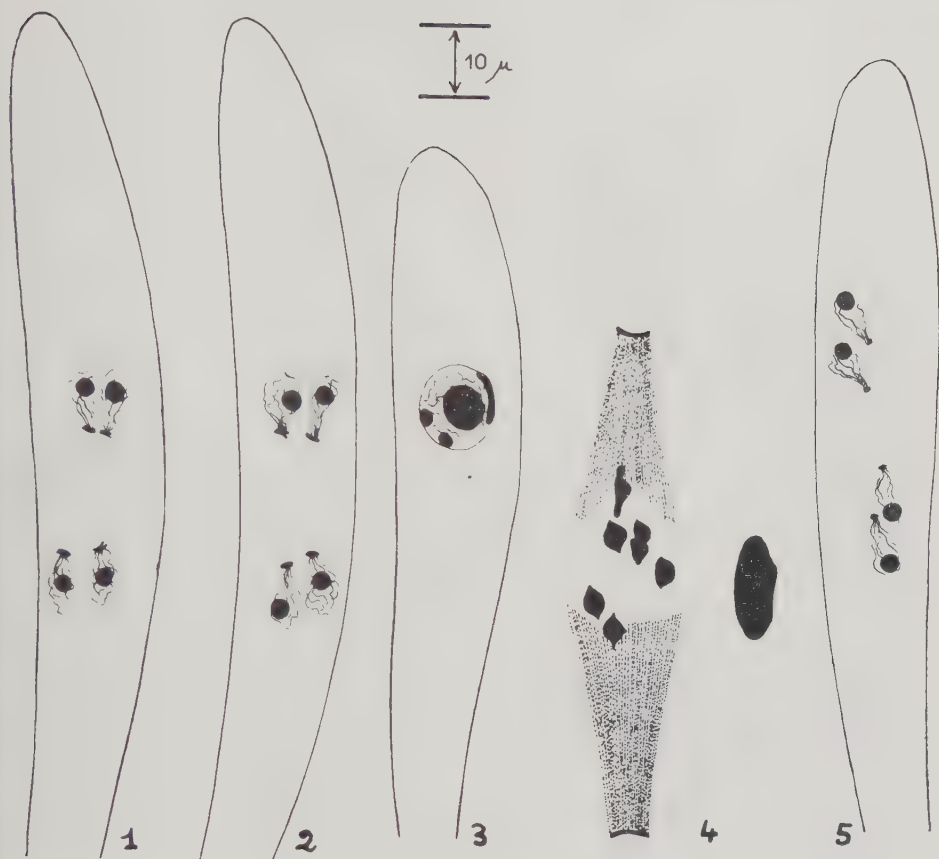
Fig. 1. — Prophase III.

Fig. 2. — Prophase III.

Fig. 3. — Métaphase III.

Fig. 4. — Fin d'anaphase III.

Fig. 5. — Début de la délimitation des ascospores. Les trois centrosomes de la partie supérieure de l'asque sont réunis à leurs noyaux respectifs par une région cytoplasmique différenciée.



Pleurage decipiens f. 16 spores

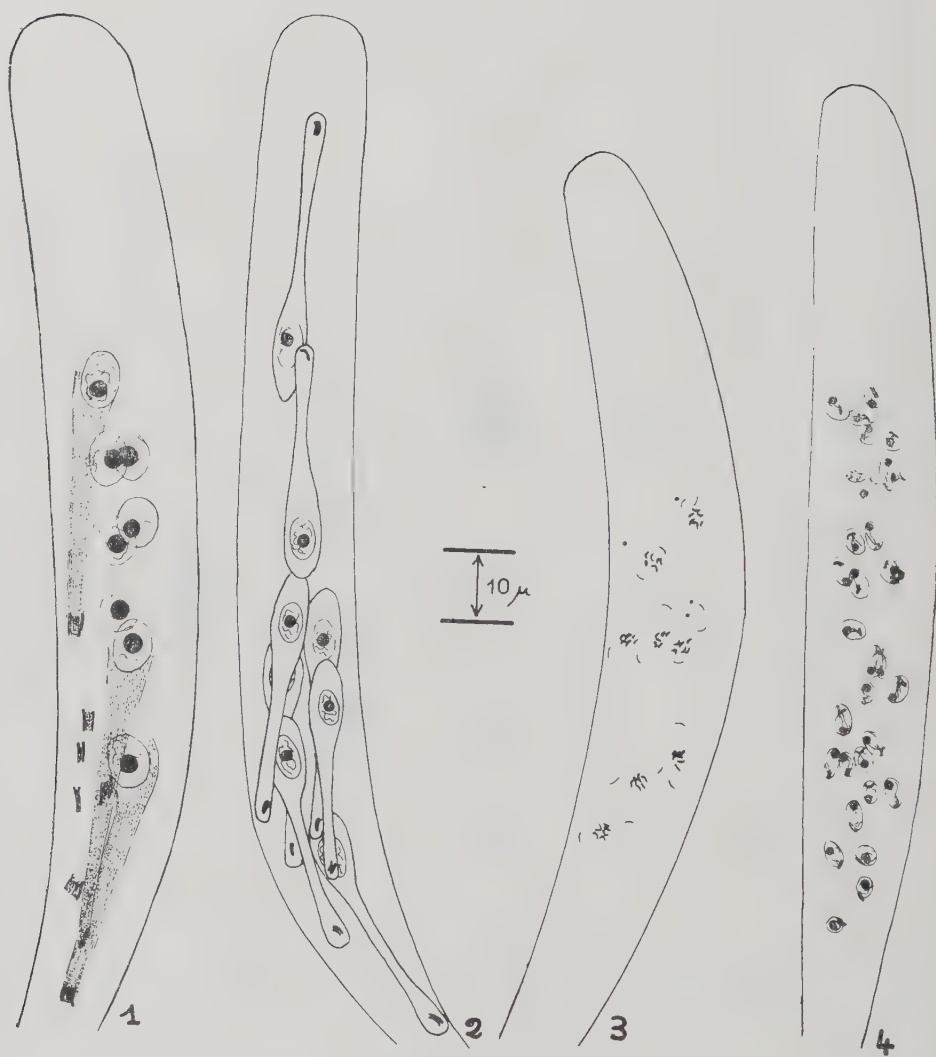
Fig. 1, 2. — Interphase III. Le même asque vu selon deux plans différents.

Pleurage curvula

Fig. 3. — Prophase I (var. *coronifera*).

Fig. 4. — Métaphase I ($n = 7$). Fibres fusoriales divergeant à partir des centrosomes. (Var. *coronifera*.)

Fig. 5. — Interphase II.



Pleurage fimiseda

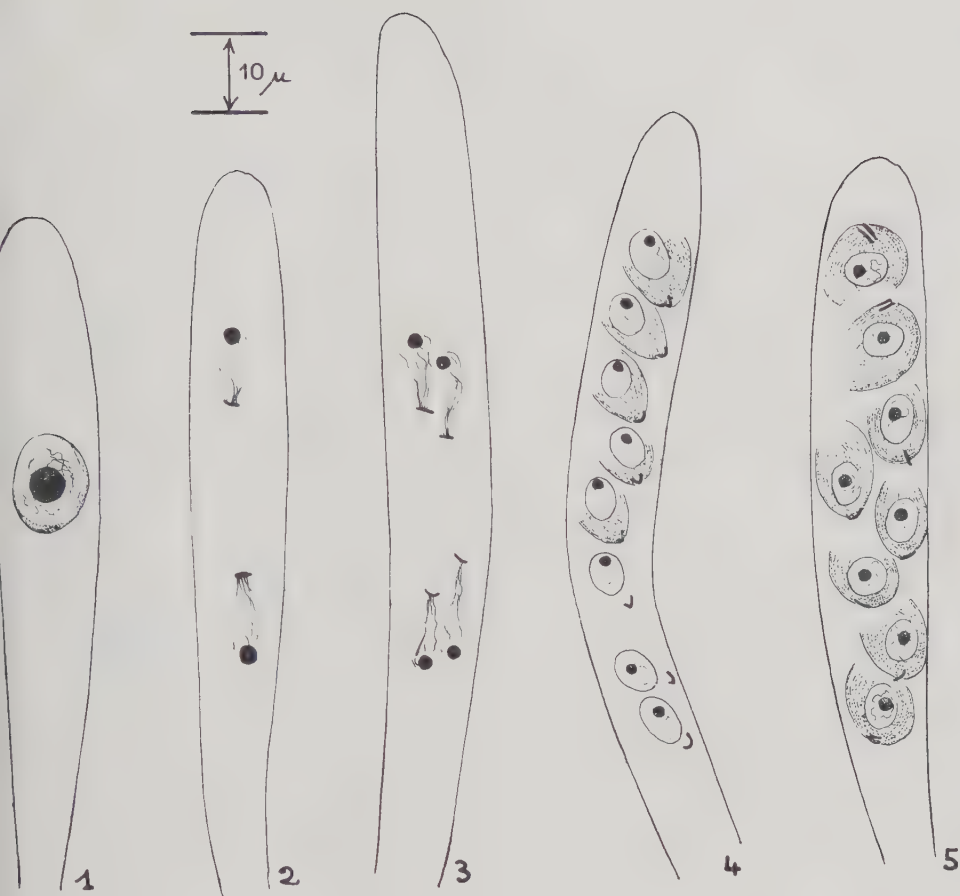
Fig. 1. — Délimitation des ascospores. Pour la clarté, la zone de cytoplasme différencié n'a été figurée que pour trois spores.

Fig. 2. — Asque dont deux spores présentent un renversement de polarité.

Pleurage setosa

Fig. 3. — Métaphase V.

Fig. 4. — Téliophase V.



Pleurage minuta f. 8 spores

Fig. 1. — Prophase I.

Fig. 2. — Prophase II.

Fig. 3. — Prophase III.

Fig. 4. — Délimitation des ascospores.

Fig. 5. — Délimitation des ascospores. Deux centrosomes placés de façon aberrante.



Pleurage minuta f. 8 spores

Fig. 1. — Délimitation des ascospores. Allongement des ébauches.

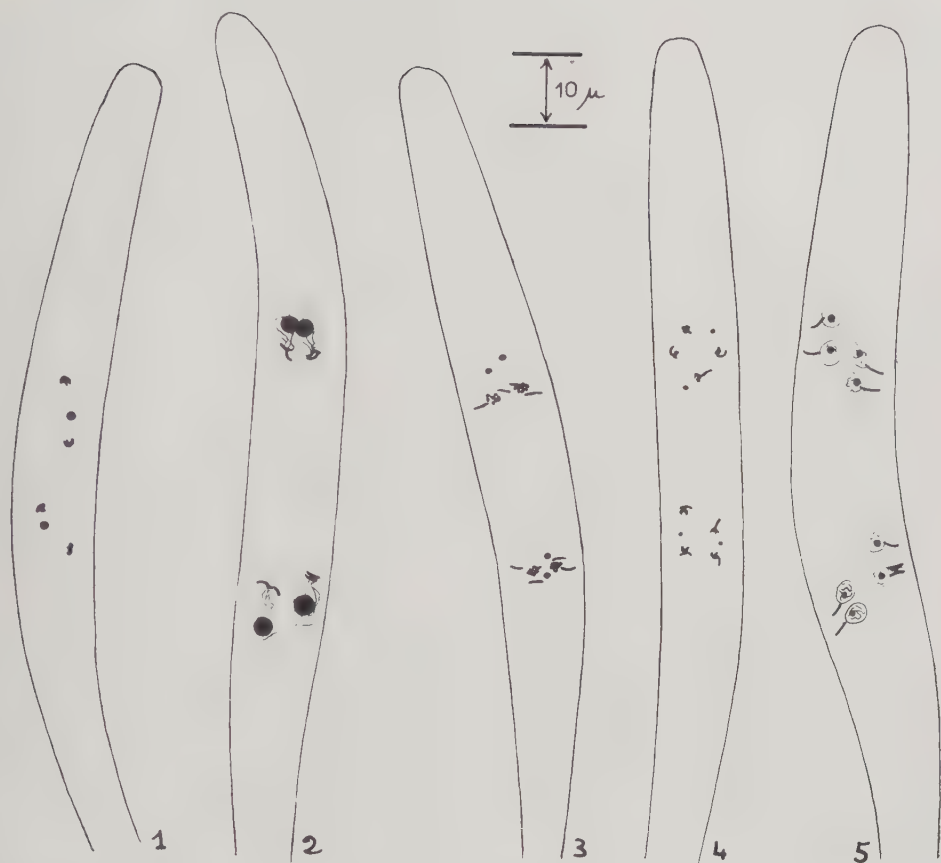
Fig. 2. — Asque renfermant huit ascospores, dont trois présentant un renversement de polarité.

Pleurage minuta f. 4 spores

Fig. 3. — Télophase III. Appariement des centrosomes et des noyaux deux à deux.

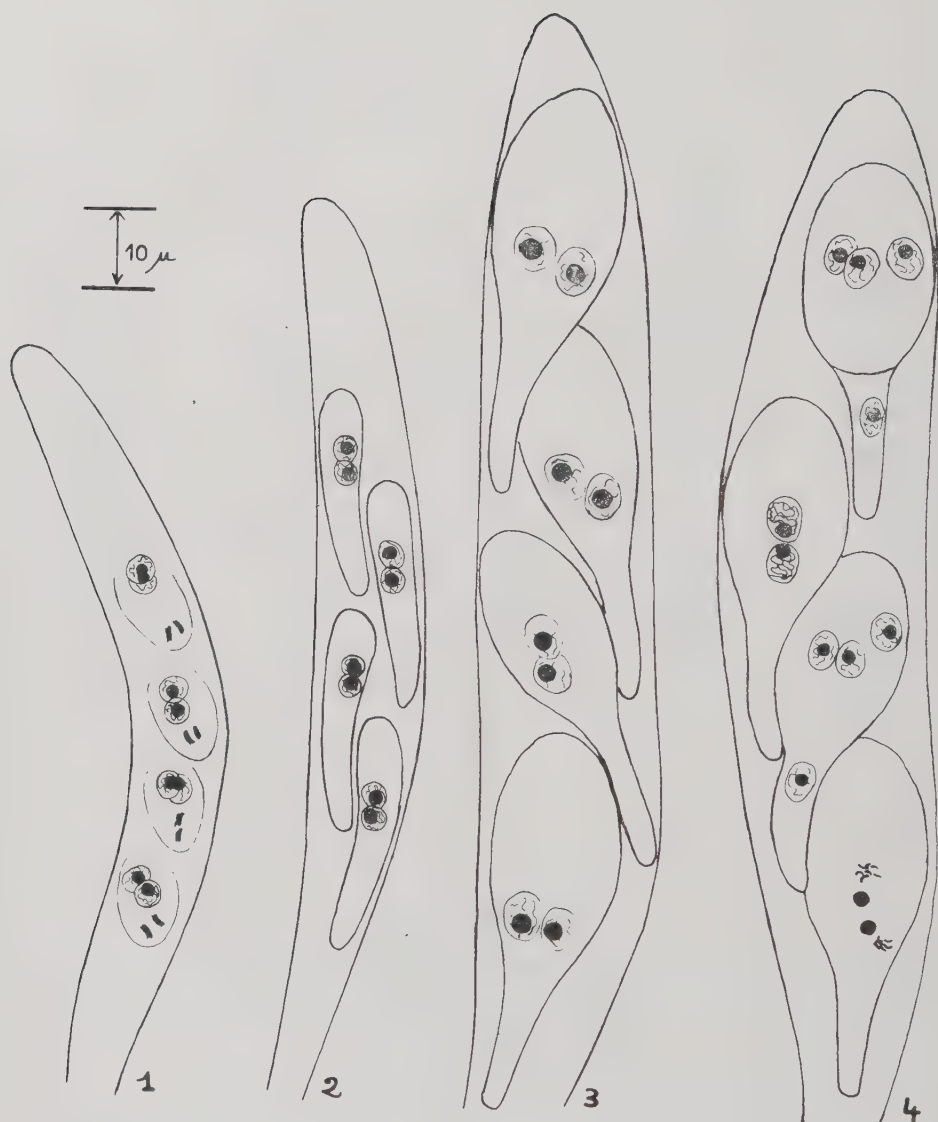
Fig. 4. — Quatre spores binucléées.

Fig. 5. — Cinq spores, dont deux uninucléées.



Pleurage anserina

- Fig. 1. — Fin d'anaphase II.
- Fig. 2. — Prophase III.
- Fig. 3. — Métaphase III.
- Fig. 4. — Fin d'anaphase III.
- Fig. 5. — Télaphase III.



Pleuraea anserina

Fig. 1. — Délimitation des ascospores.

Fig. 2. — Asque renfermant quatre ascospores binucléées.

Fig. 3. — Stade ultérieur d'évolution.

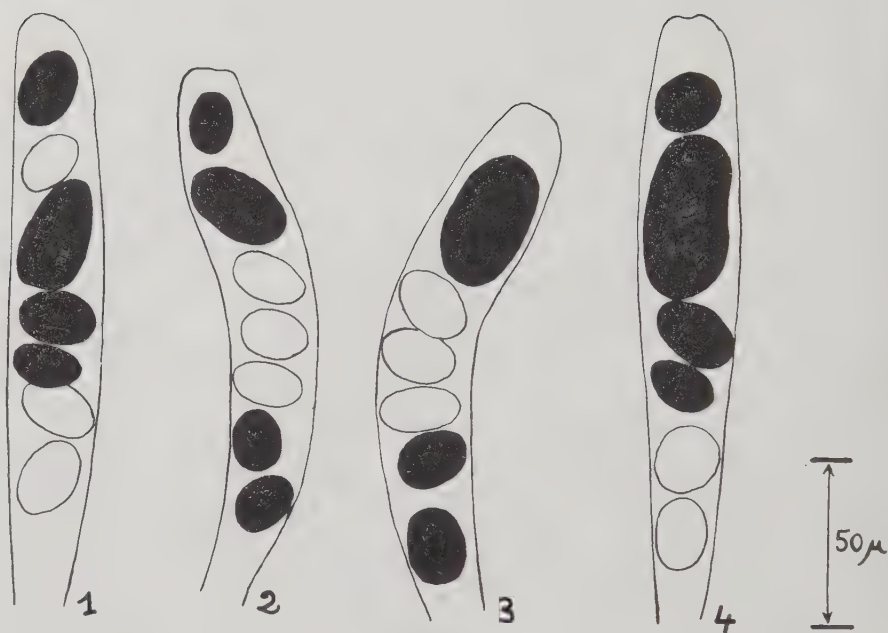
Fig. 4. — Mitose supplémentaire dans l'ascospore et migration d'un des quatre noyaux dans l'appendice primaire.



Pleurage anserina

Fig. 1. — Asque renfermant quatre ascospores mûres.

Fig. 2 et 3. — Anomalies dans la répartition des noyaux et la polarité des spores.



Sordaria macrospora

Relations de dominance des gènes commandant la couleur de l'ascospore

Fig. 1, 2, 3, 4. — Asques hybrides établissant que les gènes en cause sont récessifs. Une dose (+) domine encore deux doses d'un gène mutant.

EXPLICATION DES PLANCHES 20 A 38

PLANCHE 20. — *Sordaria macrospora*

- Fig. 1. — Métaphase I. Sept bivalents, l'un deux étant attaché à l'un des nucléoles.
Fig. 2 et 3. — Prophase III. Le même asque vu sous deux plans de mise au point différents.
Fig. 4 et 5. — Métaphase III. Centrosomes bien visibles aux pôles. Le même asque vu sous deux plans différents.
N. B. : Photographies réalisées en contraste de phase.

PLANCHE 21. — *Sordaria macrospora*

- Fig. 1 et 2. — Télaphase III. Asque écrasé montrant l'attachement de chaque centrosome à son noyau.
Fig. 3 et 4. — Délimitation des ascospores. Noter la position des centrosomes.
Fig. 5. — Même stade. Asque différent du précédent.
Fig. 6. — Asque renfermant huit spores délimitées. Les centrosomes ne sont presque plus visibles.
N. B. : Photographies réalisées en contraste de phase.

PLANCHE 22. — *Pleuraea decipiens*

- Fig. 1. — Prophase I.
Fig. 2. — Métaphase I. Centrosomes visibles aux pôles.
Fig. 3. — Fin d'anaphase I.
Fig. 4. — Prophase III.
Fig. 5. — Prophase III. Autre asque. Les deux noyaux du bas sont superposés.
Noter la divergence des bras chromosomiques à partir du centrosome.
N. B. : Photographies réalisées en contraste de phase.

PLANCHE 23. — *Pleuraea decipiens*

- Fig. 1 et 2. — Télaphase III. Le même asque sous deux plans. Sept des huit centrosomes sont nettement visibles.
Fig. 3 et 4. — Début de la délimitation des ascospores. Le même asque sous deux plans différents.
N. B. : Photographies réalisées en contraste de phase.

PLANCHE 24. — *Sordaria fimicola*

- Fig. 1. — Métaphase I (7 bivalents).
Fig. 2. — Métaphase I (7 bivalents). Asque différent du précédent.

Pleurage zygospora

Fig. 3 et 4. — Asques renfermant huit spores à des degrés variés de développement.

Fig. 5. — Asque aberrant renfermant quatre spores (au lieu de huit) qui se sont cloisonnées.

N. B. : Photographies réalisées en contraste de phase.

PLANCHE 25. — *Sordaria macrospora*

Fig. 1. — Asque du type sauvage (+).

Fig. 2. — Asque du mutant spp_1 (spores plus petites et rondes).

Fig. 3 et 4. — Asque du mutant ds_1 (spores en désordre).

Fig. 5 et 6. — Asques du mutant ds_2 (spores rondes, plus petites, en désordre).

Fig. 7 et 8. — Asques du mutant ds_3 (spores en désordre).

PLANCHE 26. — *Sordaria macrospora*

Fig. 1. — Asque induré du mutant gi_1 .

Fig. 2. — Asque mutant spa_1 (spores beaucoup plus allongées).

Fig. 3. — Asque du mutant bl_1 (spores blanches).

Fig. 4. — Asque du mutant r_1 (spores roses).

Fig. 5, 6, 7, 8. — Asques du mutant ir_1 (nombre variable de spores).

PLANCHE 27. — *Sordaria macrospora*

Asques du mutant sps_1 (nombre de spores par asque supérieur à huit).

PLANCHE 28. — *Sordaria macrospora*

Fig. 1 et 2. — Asques du mutant sps_1 .

Fig. 3 et 4. — Mutant sps_1 . Asques exceptionnels renfermant plus de huit spores nucléées.

PLANCHE 29. — *Sordaria macrospora*

Asques du mutant as_1 (spores viables plus grosses que celles du type sauvage).

PLANCHE 30. — *Sordaria macrospora*

Asques du mutant as_1 (spores viables plus grosses que celles du type sauvage).

PLANCHE 31. — *Sordaria macrospora*

Asques hybrides issus de la confrontation (+) $\times$ (bl_1).

Fig. 1. — Asque de type I.

Fig. 2. — Asque de type II.

Fig. 3. — Asque de type III.

Fig. 4. — Asque de type IV.

PLANCHE 32. — *Sordaria macrospora*

Asques hybrides issus de la confrontation $(+) \times (bl_1)$.

Fig. 1. — Asque de type V.

Fig. 2. — Asque de type VI.

Fig. 3 et 4. — Disposition résultant d'un empiètement des fuseaux à la troisième division.

PLANCHE 33. — *Sordaria macrospora*

Types de bouquets d'asques observés dans la confrontation $(+) \times (bl_1)$.

Fig. 1. — Bouquet de type sauvage $(+)$.

Fig. 2. — Bouquet d'asques hybrides.

Fig. 3. — Bouquet de type bl_1 .

Fig. 4 et 5. — Bouquets mixtes.

PLANCHE 34. — *Sordaria macrospora*

Asques hybrides issus de la confrontation $(bl_1) \times (r_1)$.

Fig. 1, 2, 3, 4. — Asques de la classe (1) renfermant quatre spores de chacun des deux types parentaux (bl_1 et r_1).

PLANCHE 35. — *Sordaria macrospora*

Asques hybrides issus de la confrontation $(bl_1) \times (r_1)$.

Fig. 1, 2, 3, 4, 5. — Asques de la classe (2) renfermant deux spores de chacun des deux types parentaux (bl_1 et r_1) et deux spores de types recombinants ($+$ et $bl_1 r_1$). Les spores $bl_1 r_1$ sont indistinguables des spores bl_1 (bl_1 est épistatique sur r_1).

PLANCHE 36. — *Sordaria macrospora*

Asques hybrides issus de la confrontation $(bl_1) \times (r_1)$.

Fig. 1, 2, 3, 4. — Asques de la classe (3) renfermant quatre spores de chacun des deux types recombinants ($+$ et $bl_1 r_1$). bl_1 est épistatique sur r_1 .

PLANCHE 37. — *Sordaria macrospora*

Asques hybrides résultant de la confrontation $(+) \times (T-1)$. La souche T-1 est porteuse d'une translocation réciproque.

Fig. 1. — Asque renfermant huit spores viables.

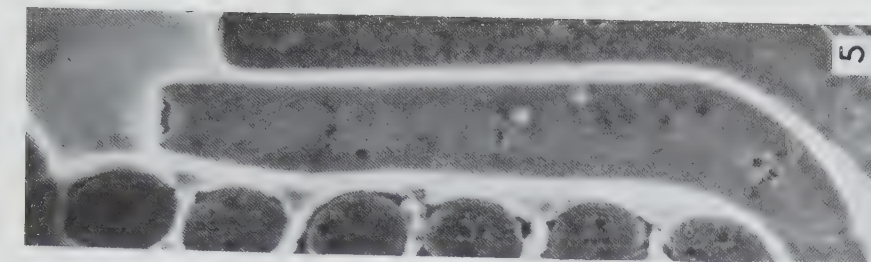
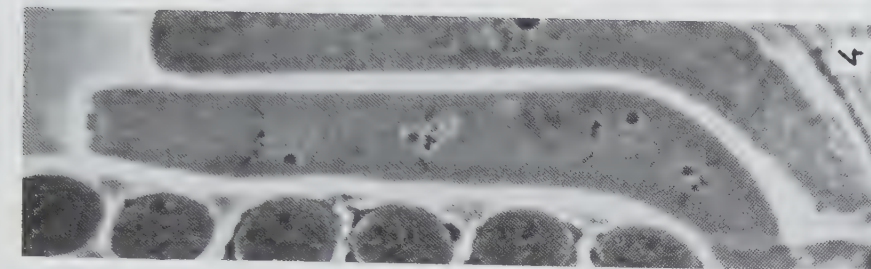
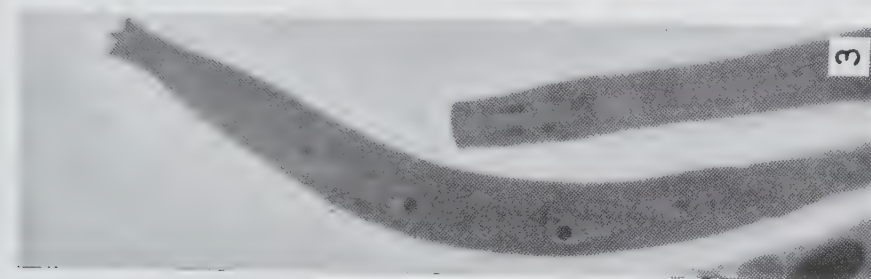
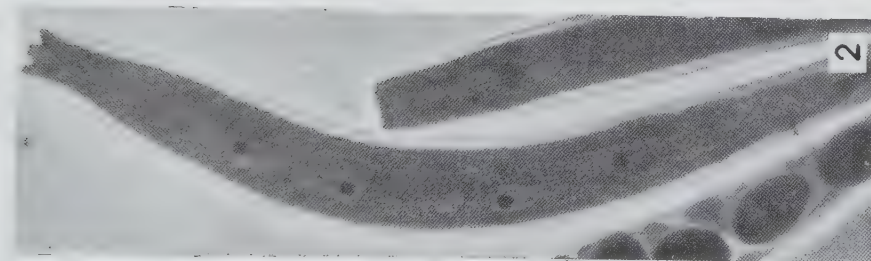
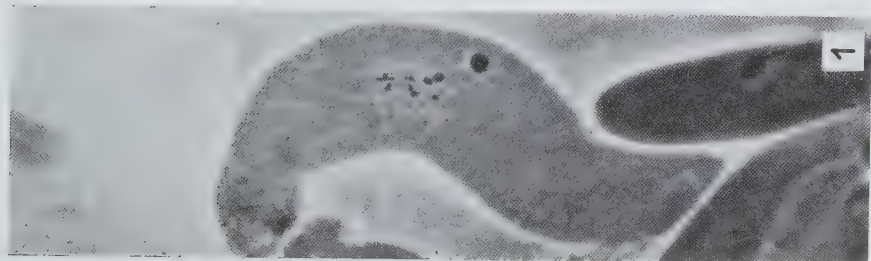
Fig. 2, 3, 4, 5. — Asques renfermant quatre spores viables et quatre spores avortées de deux sortes (jaunes et blanches).

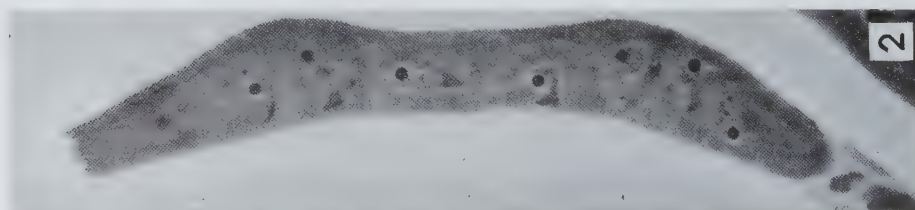
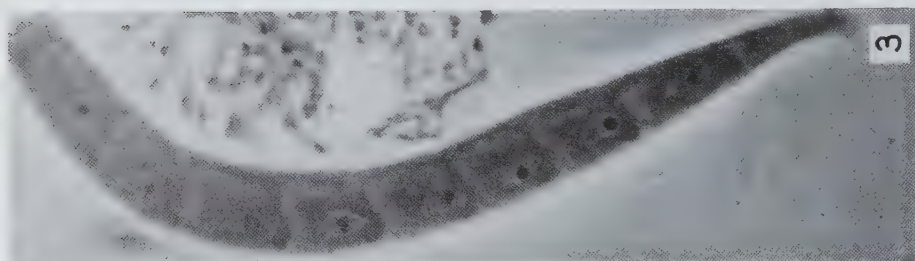
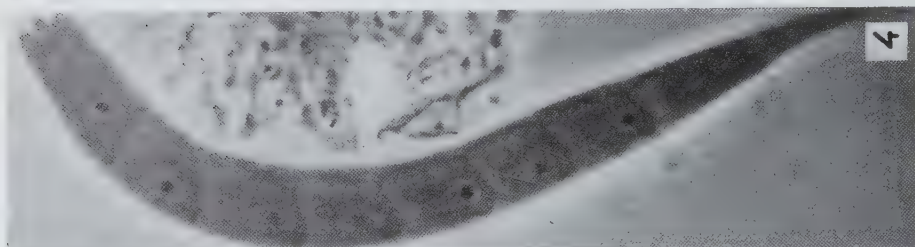
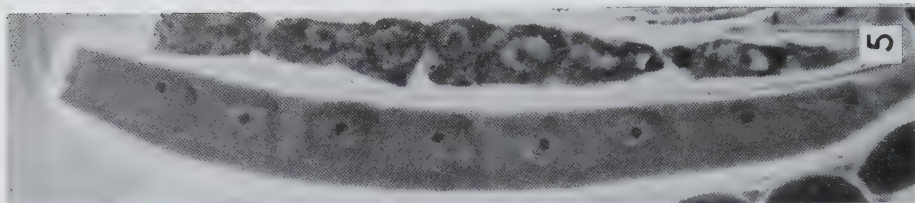
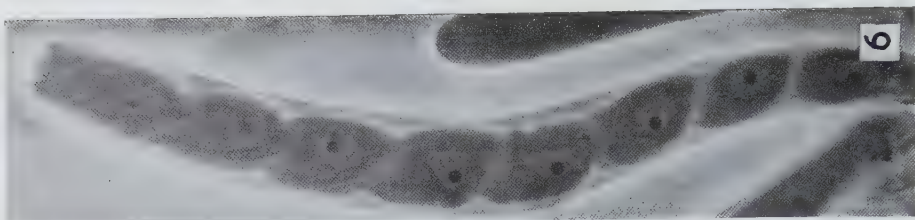
PLANCHE 38. — *Sordaria macrospora*

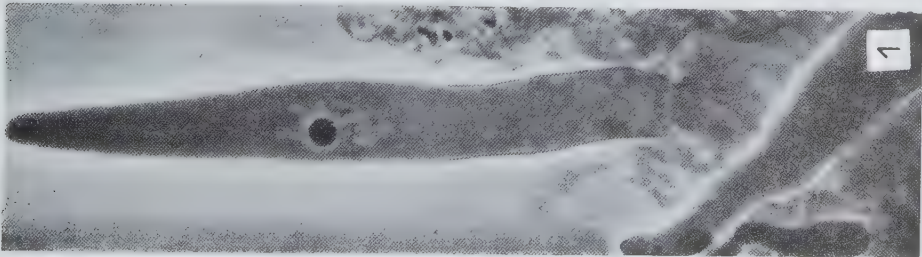
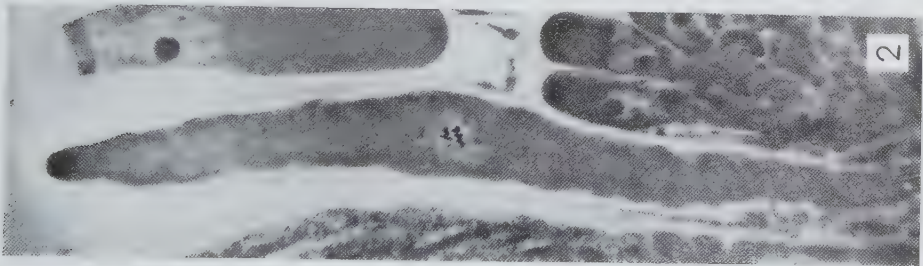
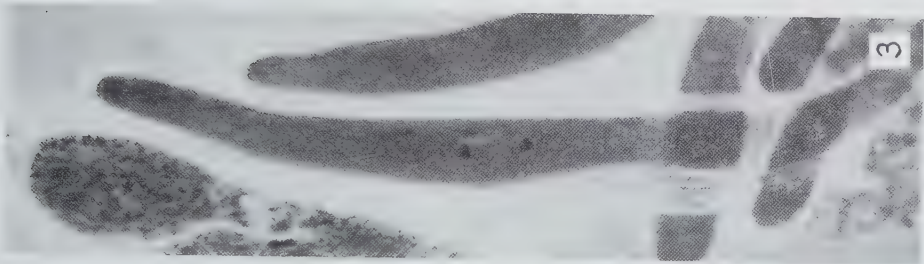
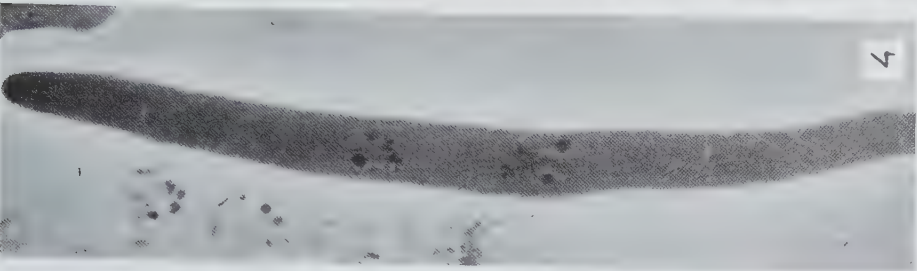
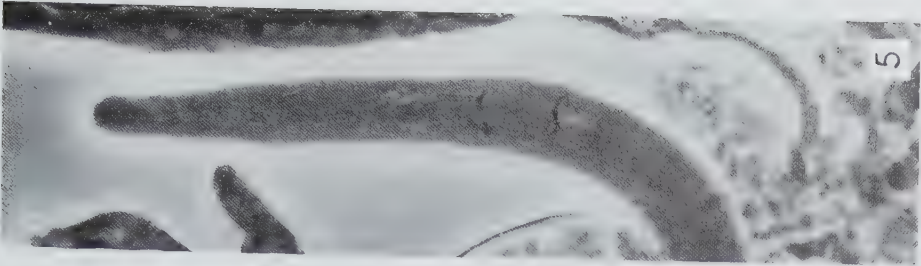
Asques hybrides résultant de la confrontation $(+) \times (T-1)$. La souche T-1 est porteuse d'une translocation réciproque.

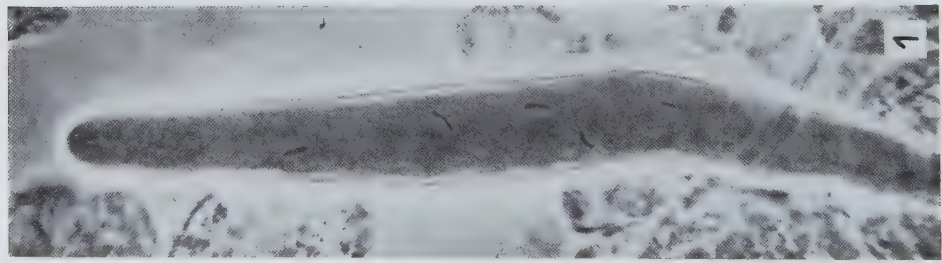
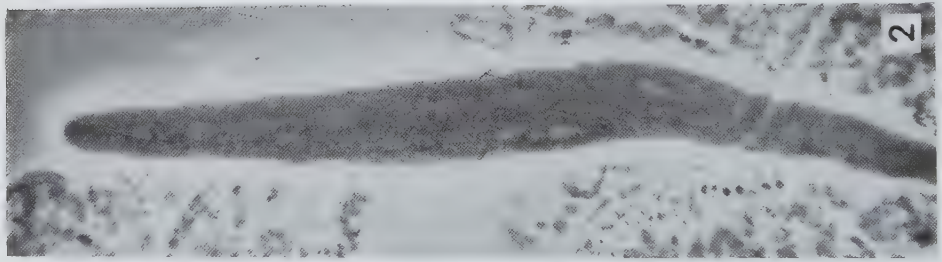
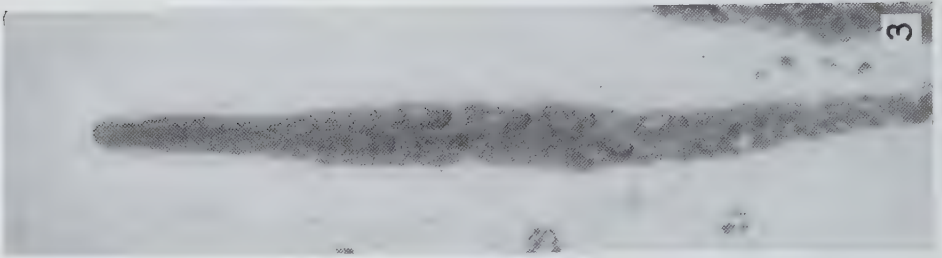
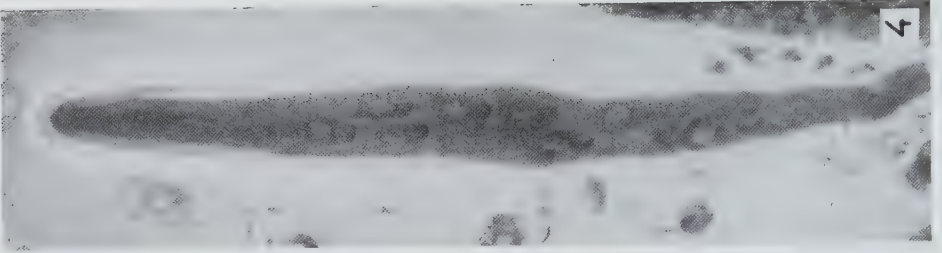
Fig. 1. — Asque renfermant quatre spores viables et quatre spores avortées de deux sortes (jaunes et blanches).

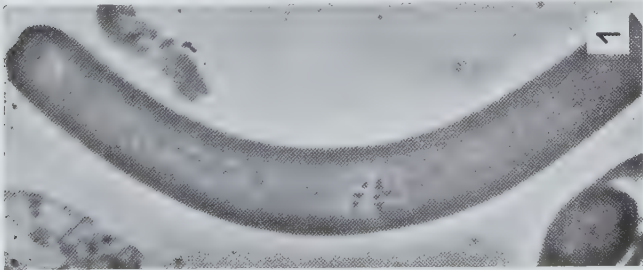
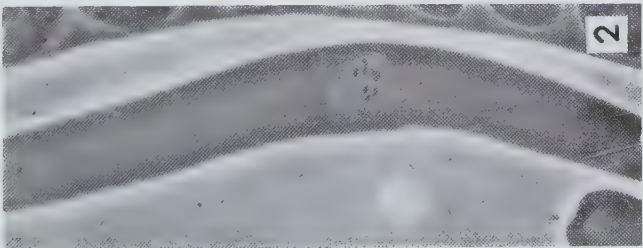
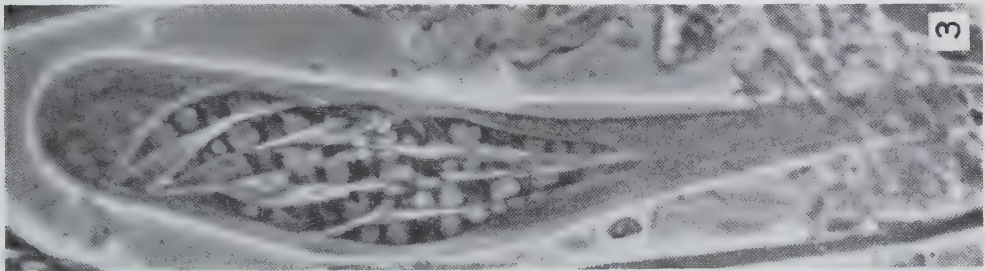
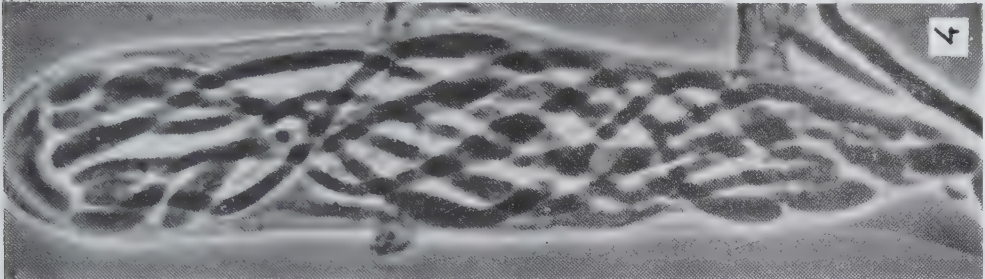
Fig. 2, 3, 4, 5. — Asques renfermant huit spores avortées de deux sortes (jaunes et blanches).

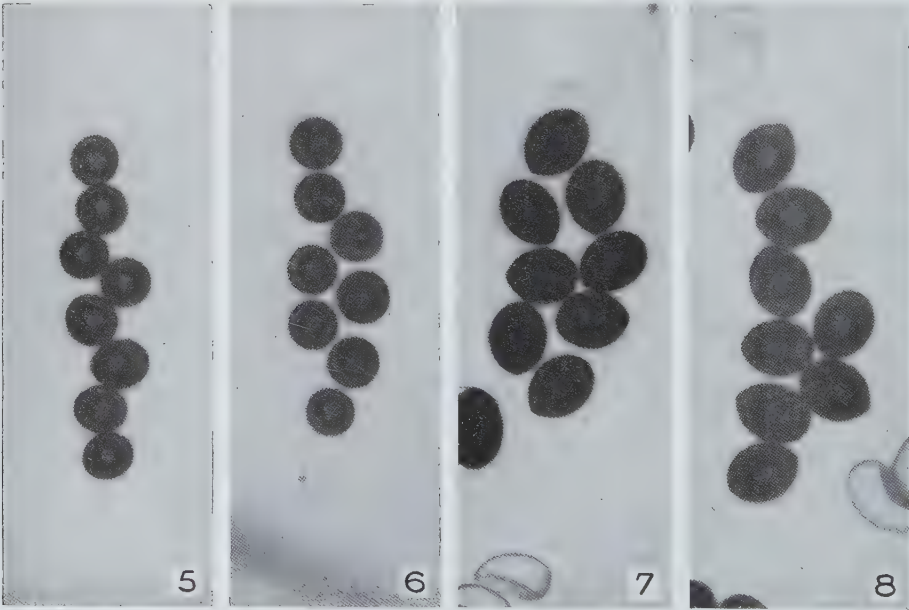
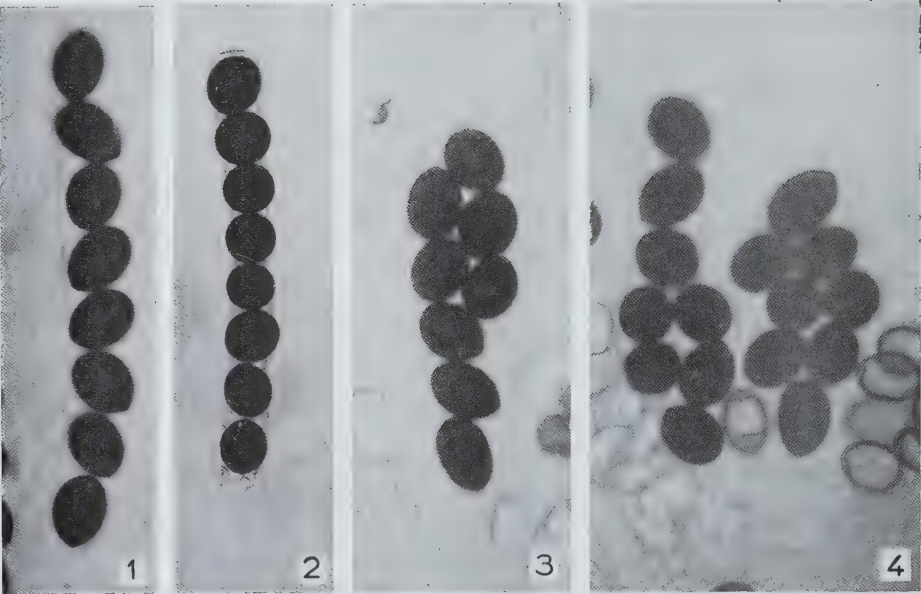




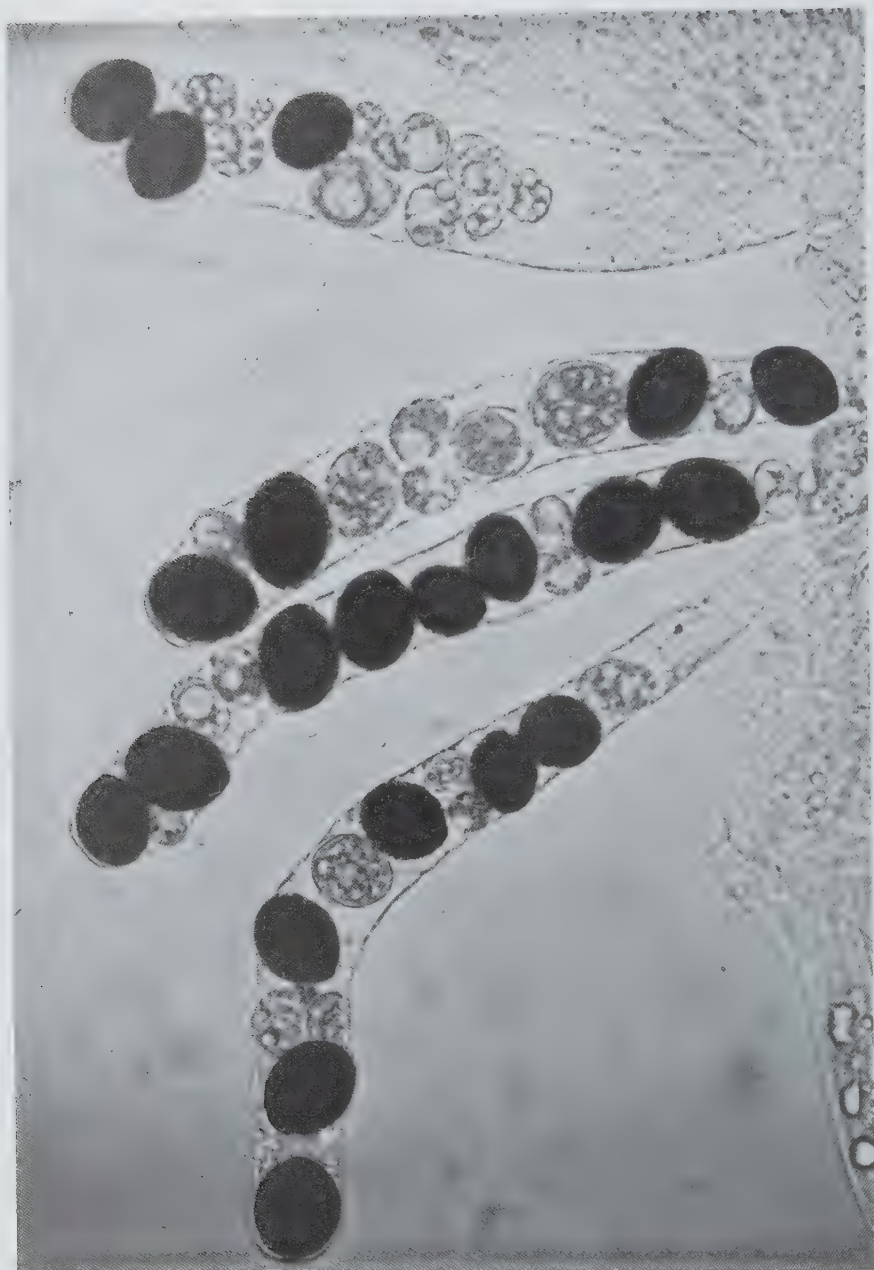


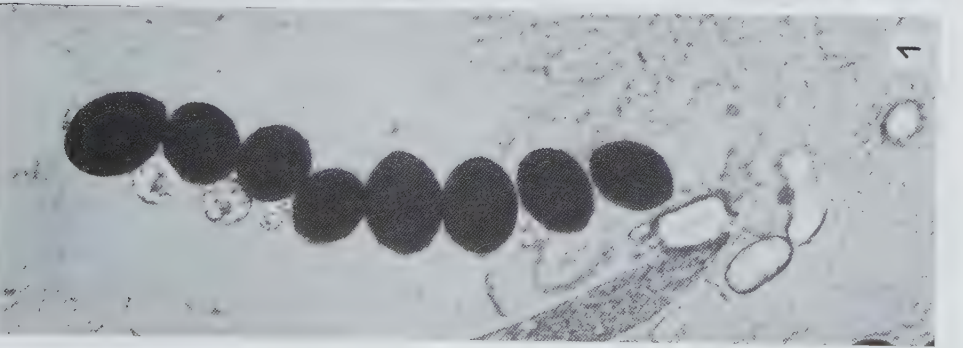
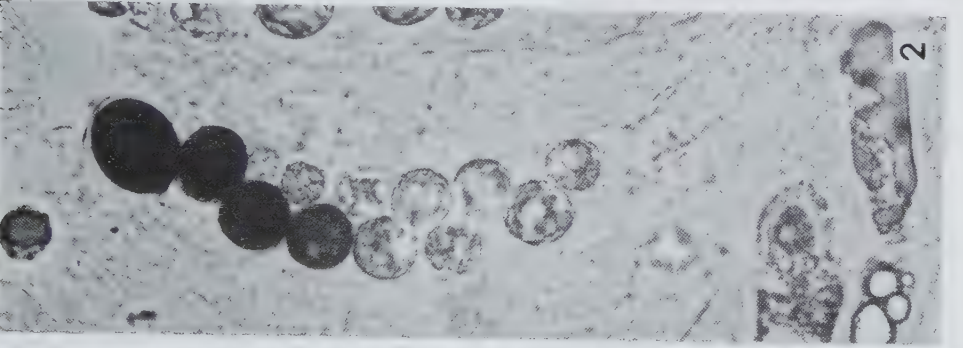
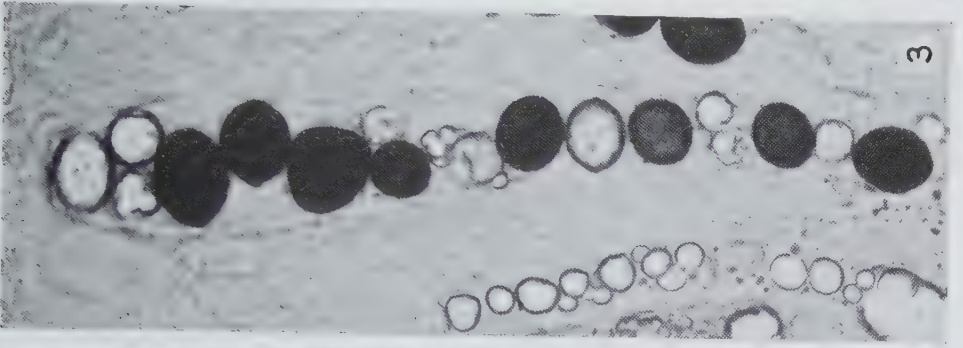
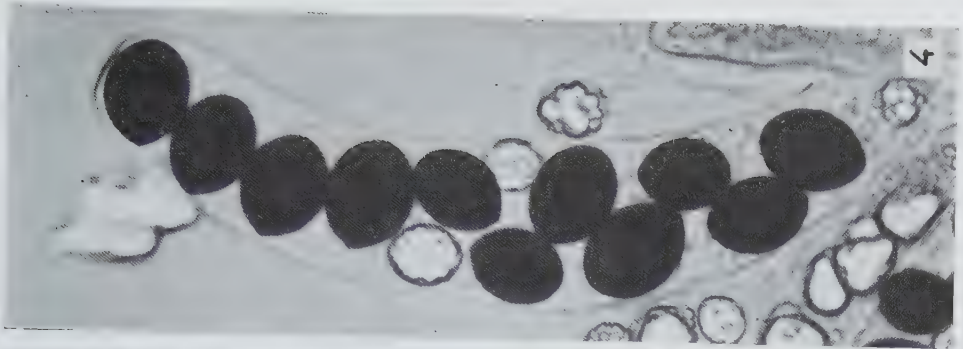


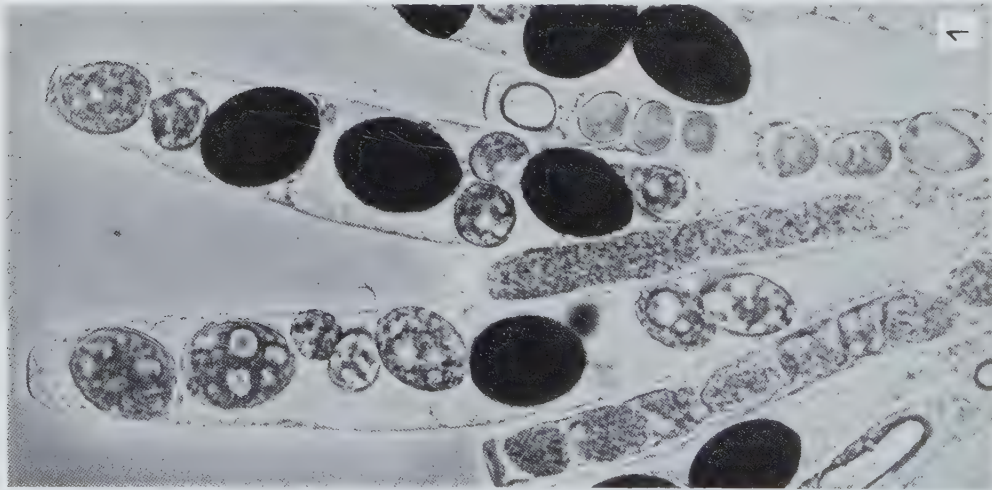
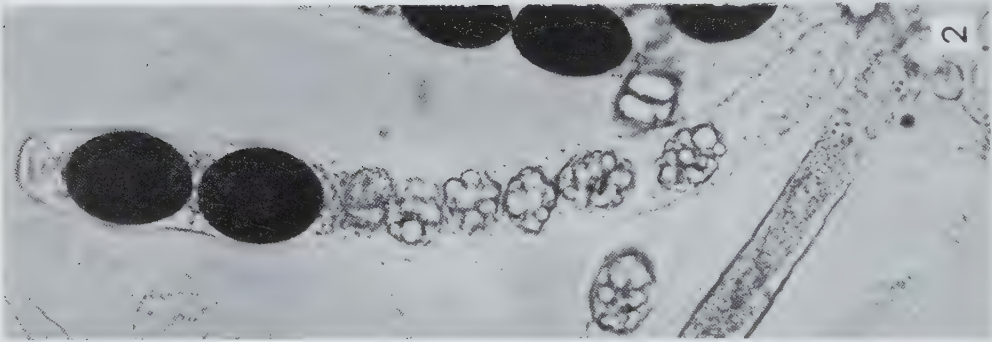


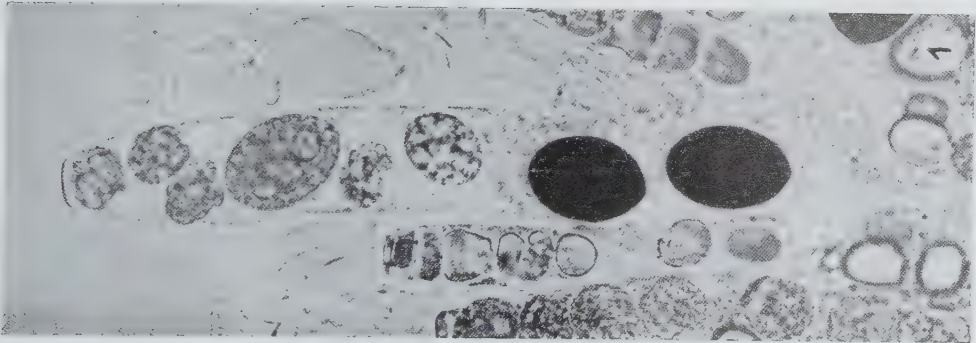
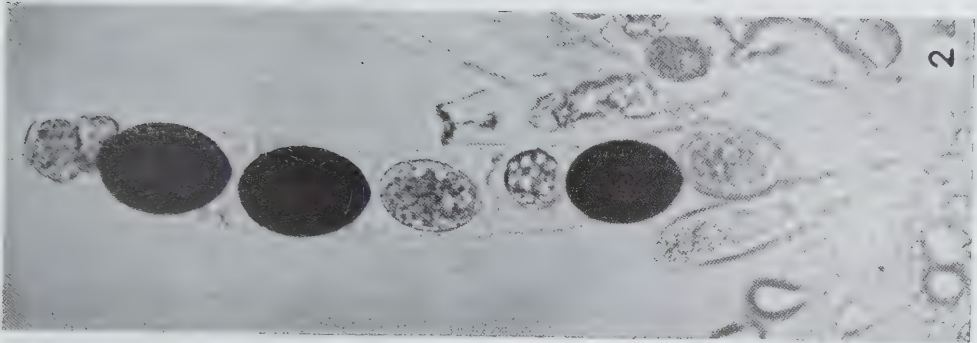


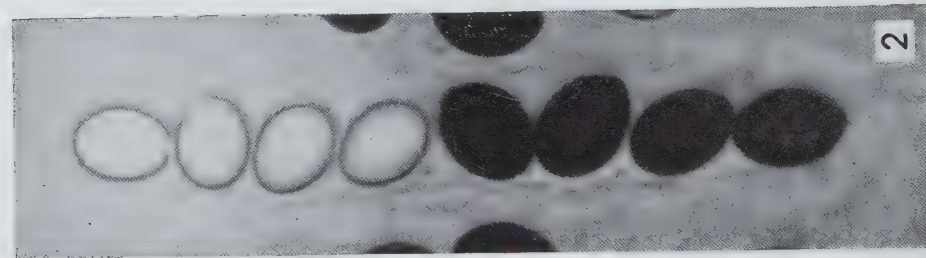


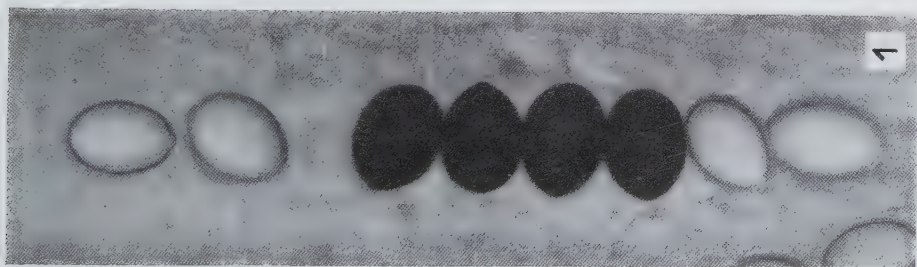
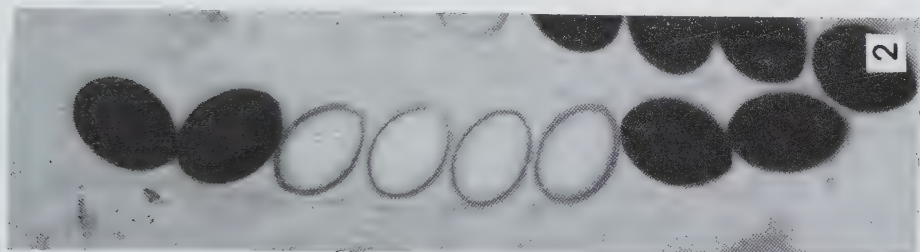
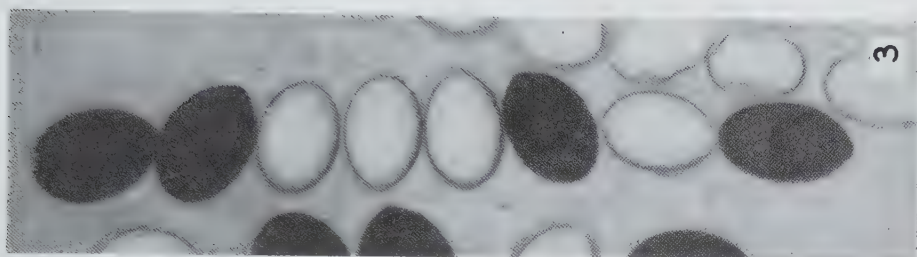


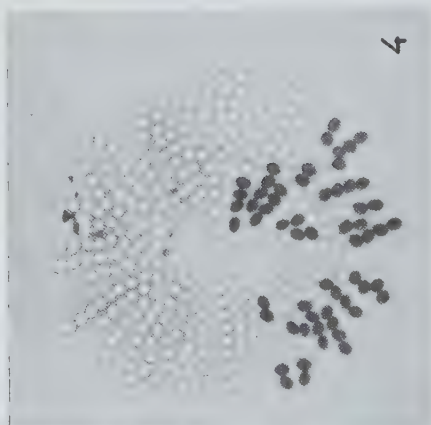
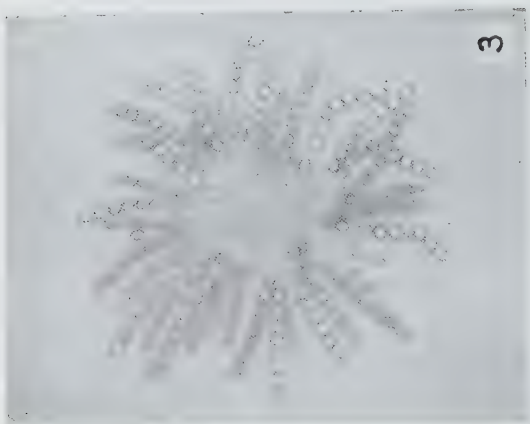
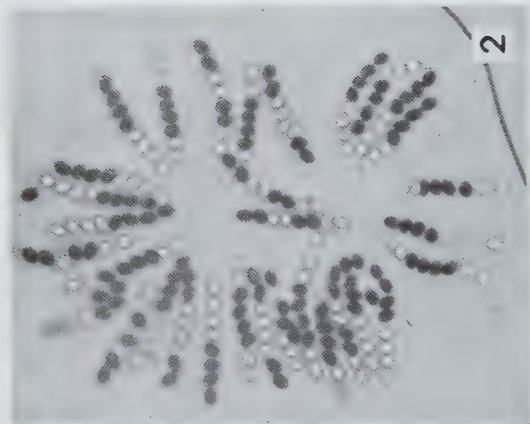
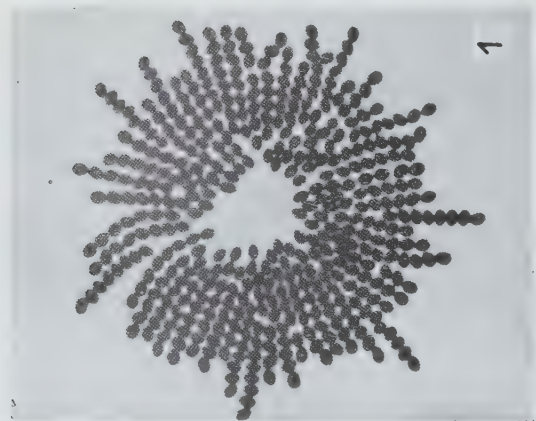


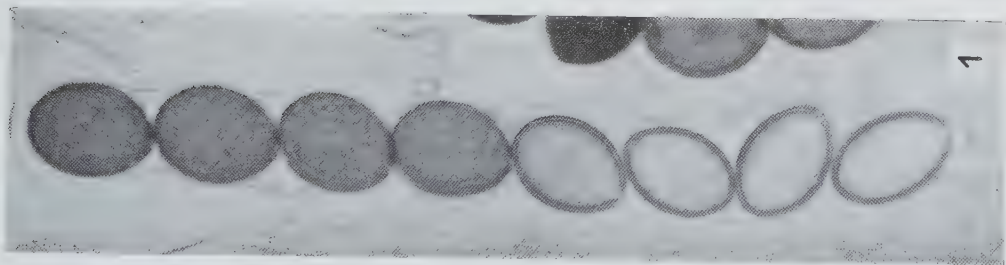
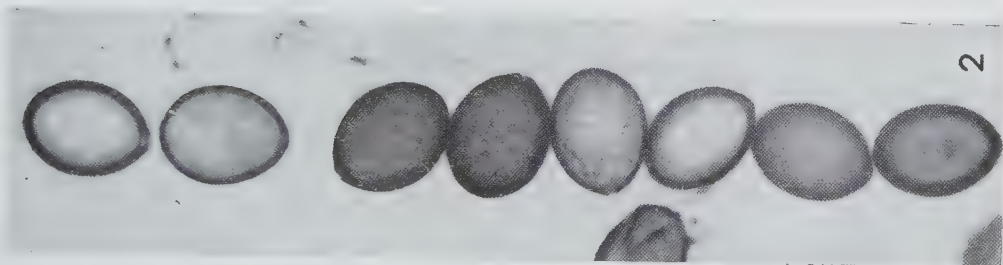
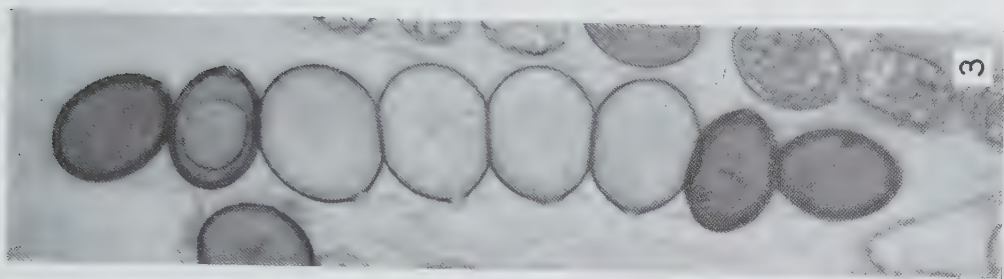
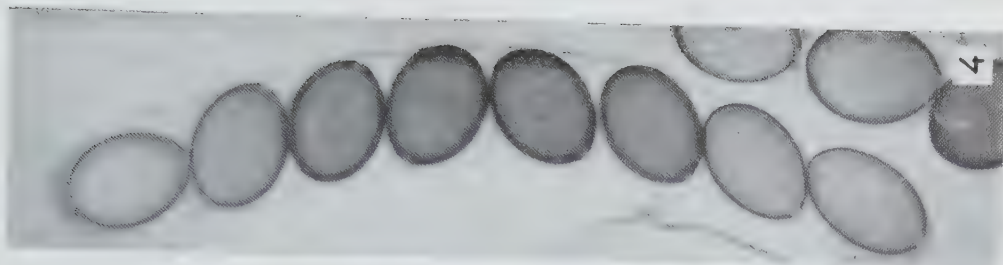


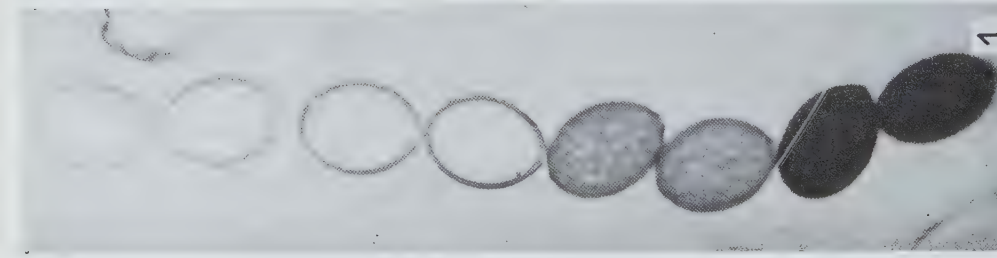
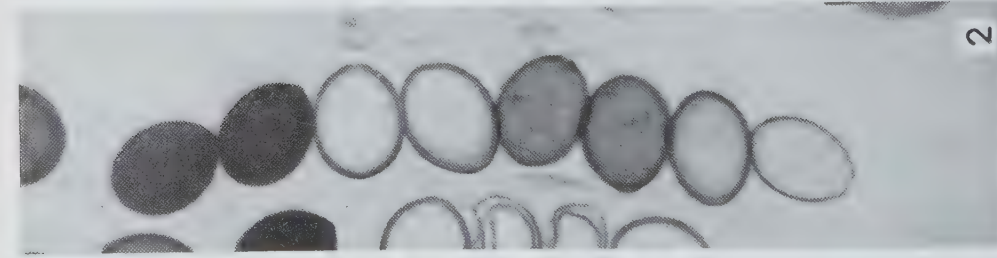
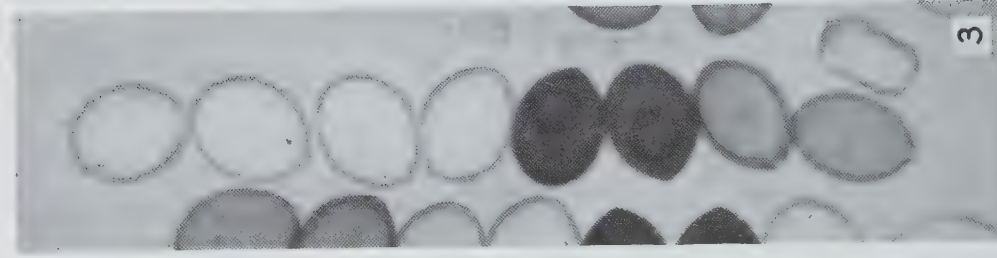
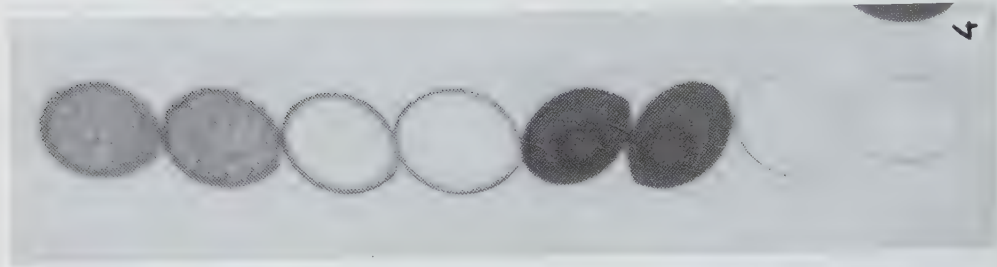


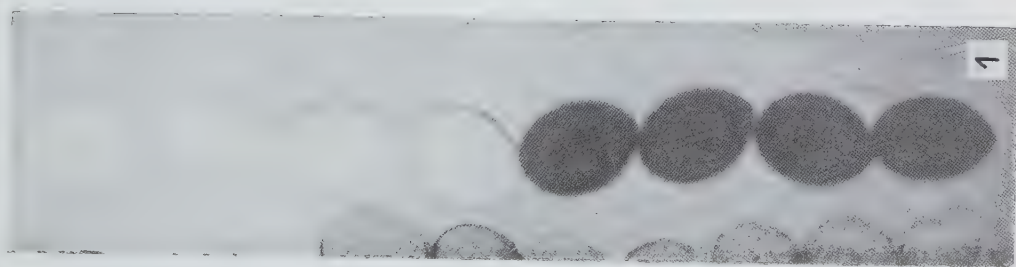
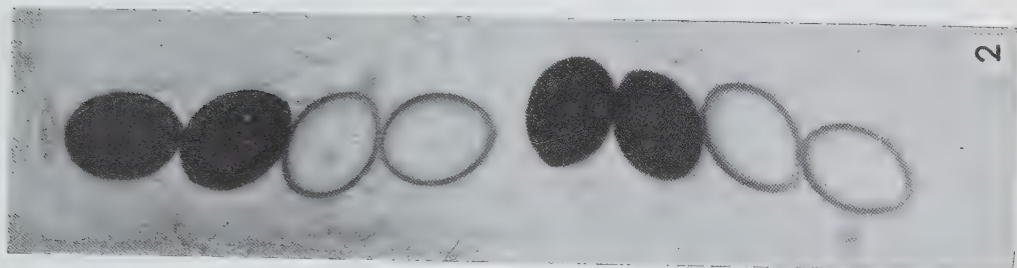
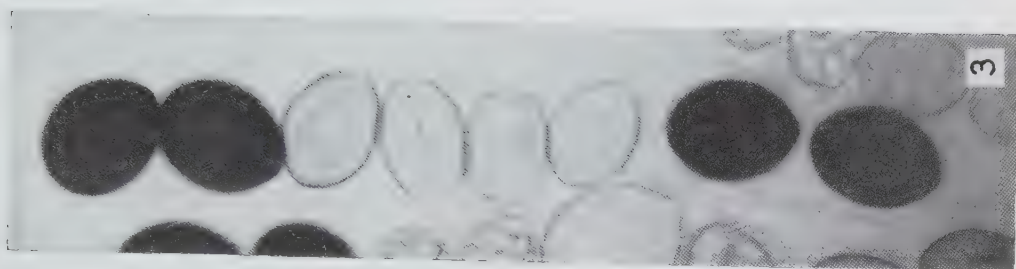
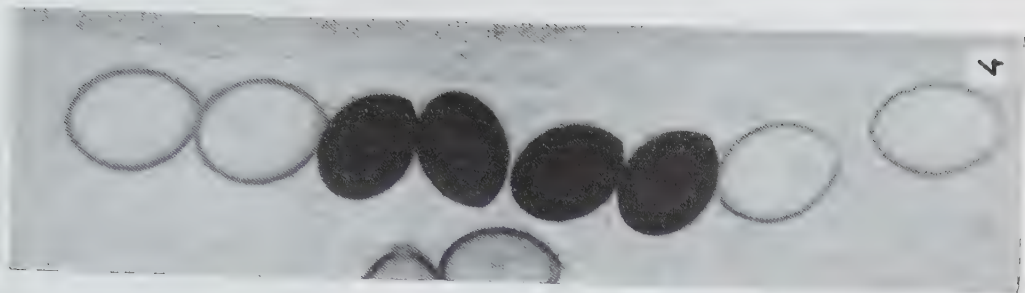


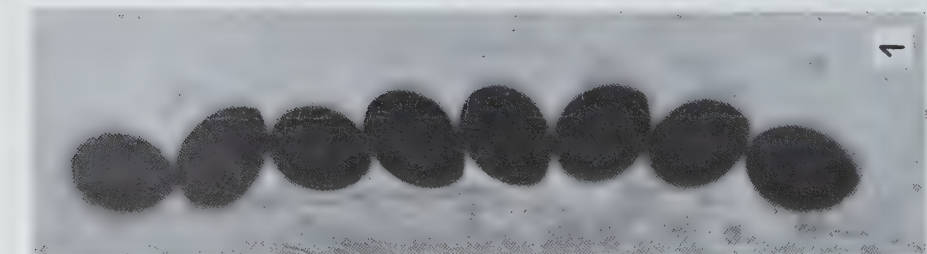
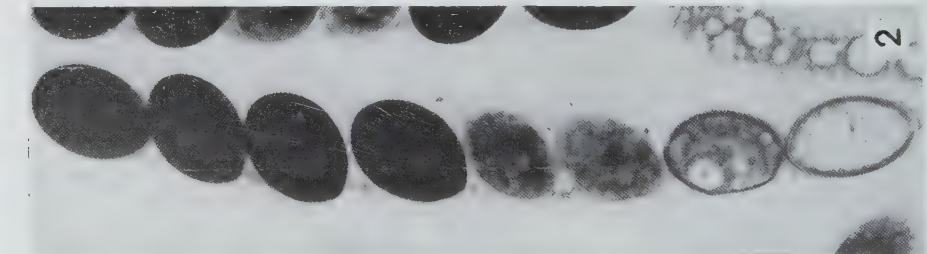
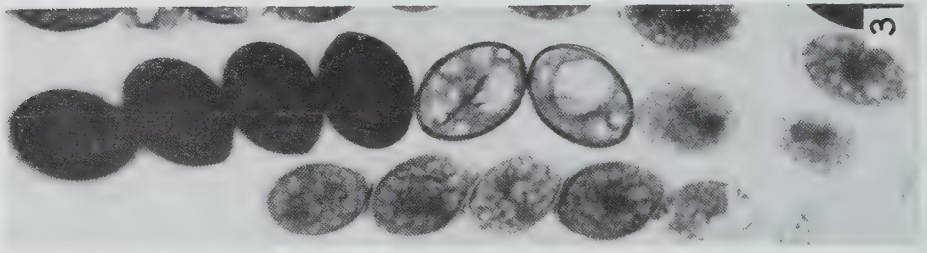
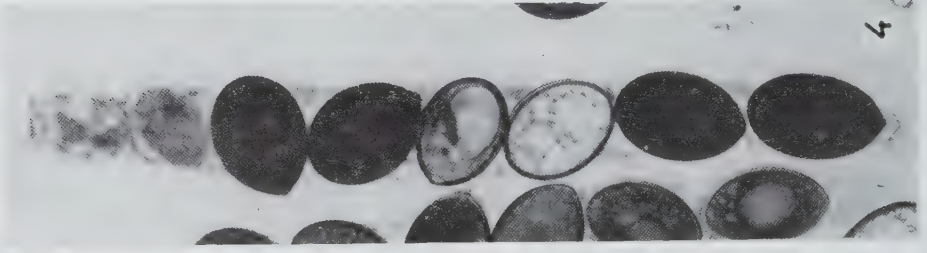
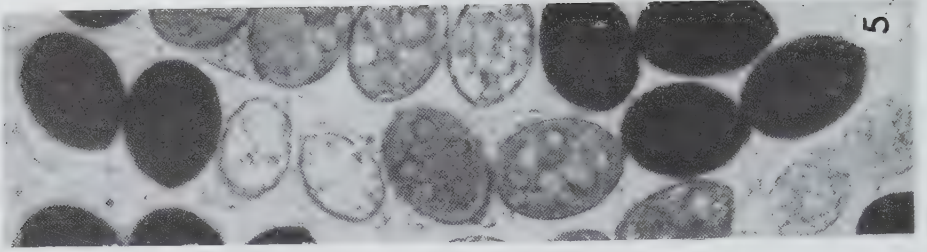


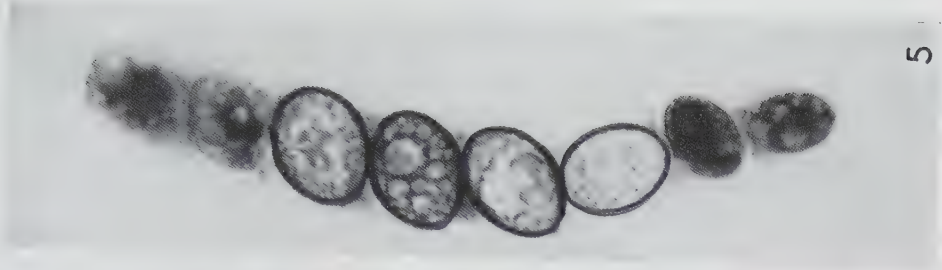
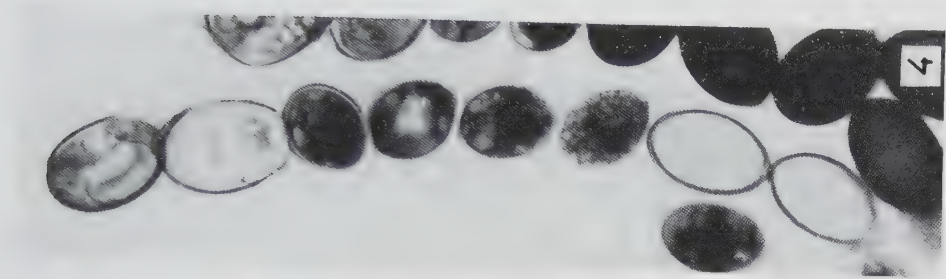
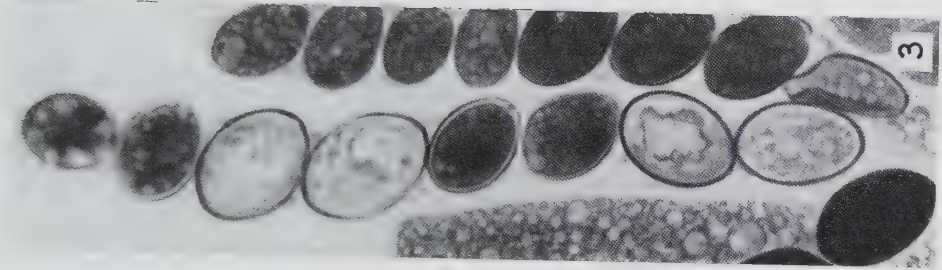
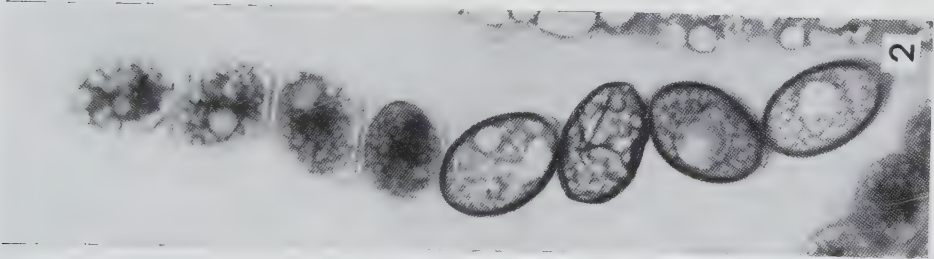
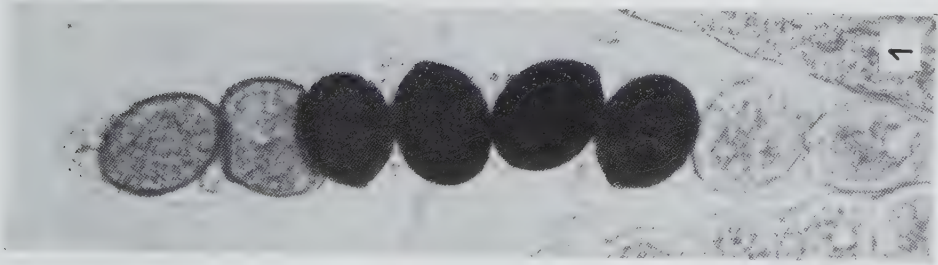












DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

LES SUBSTANCES RADIOMIMÉTIQUES

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 9 Juin 1957,

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

PIERRE ANDRÉ, Imp.
244, Boulevard Raspail,
PARIS XIV^e

Dépôt légal, 4^e trimestre 1958